

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 701**

51 Int. Cl.:

A61K 38/04 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

A61K 39/085 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.07.2011 PCT/US2011/042845**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.01.2012 WO12003474**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2011 E 11801511 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017 EP 2588120**

54 Título: **Composiciones y métodos relacionados con variantes de la proteína A (SpA)**

30 Prioridad:

02.07.2010 US 361218 P
04.08.2010 US 370725 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.02.2018

73 Titular/es:

THE UNIVERSITY OF CHICAGO (100.0%)
5801 South Ellis Avenue
Chicago, IL 60637, US

72 Inventor/es:

SCHNEEWIND, OLAF;
CHENG, ALICE, G.;
MISSIAKAS, DOMINIQUE, M. y
KIM, HWAN

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 655 701 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos relacionados con variantes de la proteína A (SpA)

- 5 La presente invención se realizó con apoyo gubernamental en virtud de AI057153, AI052474 y GM007281 concedidas por los Institutos Nacionales de la Salud. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

I. Campo de la invención

- 10 La presente invención se refiere, en general, a los campos de la Inmunología, la Microbiología y la Patología. Más concretamente, se refiere a métodos y a composiciones que implican variantes de la proteína A bacteriana, que se pueden usar para generar una respuesta inmune.

II. Antecedentes

- 15 El número de infecciones contraídas tanto fuera como dentro de los hospitales ha aumentado en los últimos años con el aumento del uso de dispositivos intravasculares. Las infecciones intrahospitalarias (nosocomiales) causan una gran morbilidad y mortalidad, más concretamente, en Estados Unidos, donde afectan a más de 2 millones de pacientes al año. Las infecciones más frecuentes son infecciones del tracto urinario (el 33 % de las infecciones), seguidas por la neumonía (15,5 %), las infecciones de sitios quirúrgicos (14,8 %) y las infecciones primarias del torrente sanguíneo (13 %) (Emori y Gaynes, 1993).

- 20 Los patógenos nosocomiales más importantes incluyen *Staphylococcus aureus*, estafilococos coagulasa negativos (principalmente *Staphylococcus epidermidis*), *enterococcus* sp., *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Aunque estos patógenos causan aproximadamente el mismo número de infecciones, la gravedad de los trastornos que producen en combinación con la frecuencia de aislados resistentes a antibióticos nivelan esta clasificación hacia *S. aureus* y *S. epidermidis* como los patógenos nosocomiales más importantes.

- 30 Los estafilococos pueden causar una amplia variedad de enfermedades en los seres humanos y otros animales, bien a través de la producción o la invasión de toxinas. Las toxinas estafilocócicas también son una causa común de intoxicación alimentaria, pues las bacterias pueden crecer en alimentos no almacenados de forma apropiada.

- 35 *Staphylococcus epidermidis* es un comensal habitual de la piel que es además un importante patógeno oportunista responsable de infecciones producidas en dispositivos médicos defectuosos e infecciones en los sitios quirúrgicos. Los dispositivos médicos infectados por *S. epidermidis* incluyen normalizadores de pulsaciones cardíacas, derivaciones del líquido cefalorraquídeo, catéteres para diálisis peritoneal ambulatoria continua, dispositivos ortopédicos y válvulas cardíacas protésicas.

- 40 *Staphylococcus aureus* es la causa más común de las infecciones nosocomiales, con importantes morbilidad y mortalidad. Es la causa de algunos casos de osteomielitis, endocarditis, artritis séptica, neumonía, abscesos y síndrome del choque tóxico. *S. aureus* puede sobrevivir en superficies secas, aumentando la posibilidad de transmisión. Cualquier infección por *S. aureus* puede causar el síndrome estafilocócico de la piel escaldada, una reacción cutánea a la exotoxina absorbida en el torrente sanguíneo. También puede causar un tipo de septicemia denominada piemia, que puede suponer un peligro para la vida. Existe el problema de que *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina (MRSA) se ha convertido en la principal causa de infecciones intrahospitalarias.

- 45 Las infecciones por *S. aureus* y *S. epidermidis* normalmente se tratan con antibióticos, siendo la penicilina el fármaco escogido, mientras que la vancomicina se usa para los aislados resistentes a la metilina. El porcentaje de cepas estafilocócicas que muestran una resistencia de amplio espectro a los antibióticos se ha vuelto cada vez más frecuente, lo que supone una amenaza para una terapia antimicrobiana eficaz. Además, la reciente aparición de una cepa de *S. aureus* resistente a la vancomicina ha suscitado el temor de que están surgiendo y propagándose cepas de MRSA para las que no se dispone de una terapia eficaz.

- 50 Se encuentra en investigación una alternativa al tratamiento con antibióticos para las infecciones estafilocócicas que usa anticuerpos dirigidos contra antígenos estafilocócicos. Dicha terapia implica la administración de antisero policlonal (documentos WO00/15238 y WO00/12132) o el tratamiento con anticuerpos monoclonales contra el ácido lipoteicoico (documento WO98/57994).

- 60 Un enfoque alternativo sería el uso de una vacuna activa para generar una respuesta inmune contra los estafilococos. Se ha secuenciado el genoma del *S. aureus*, y se han identificado muchas de las secuencias codificantes (documentos WO02/094868 y EP0786519), que pueden conducir a la identificación de posibles antígenos. Lo mismo ocurre para *S. epidermidis* (documento WO01/34809). Como perfeccionamiento de dicho enfoque, otros investigadores han identificado proteínas que son reconocidas por el suero hiperinmune de pacientes que han padecido una infección por estafilococos (documentos WO01/98499 y WO02/059148).

65

S. aureus secreta una plétora de factores de virulencia en medio extracelular (Archer, 1998; Dinges *et al.*, 2000; Foster, 2005; Shaw *et al.*, 2004; Sibbald *et al.*, 2006). Como la mayoría de las proteínas secretadas, estos factores de virulencia son trasladados por la maquinaria Sec a través de la membrana plasmática. Las proteínas secretadas por la maquinaria Sec portan un péptido líder N-terminal que es eliminado por una peptidasa líder una vez que la preproteína se acopla en el translocón Sec (Dalbey y Wickner, 1985; van Wely *et al.*, 2001). Un análisis reciente del genoma sugiere que las actinobacterias y los miembros de las Firmicutes codifican un sistema de secreción adicional que reconoce un subconjunto de proteínas de manera independiente de Sec (Pallen, 2002). ESAT-6 (antígeno diana de secreción temprana de 6 kDa) y CFP-10 (antígeno de filtrado de cultivos de 10 kDa) de *Mycobacterium tuberculosis* representan los primeros sustratos de este nuevo sistema de secreción denominado ESX-1 o Snm en *M. tuberculosis* (Andersen *et al.*, 1995; Hsu *et al.*, 2003; Pym *et al.*, 2003; Stanley *et al.*, 2003). En *S. aureus*, dos factores similares a ESAT-6 denominados EsxA y EsxB son secretados por la vía Ess (sistema de secreción de ESAT-6) (Burts *et al.*, 2005).

La primera generación de vacunas dirigidas contra *S. aureus* o contra las exoproteínas que produce han alcanzado un éxito limitado (Lee, 1996). Sigue existiendo la necesidad de desarrollar vacunas eficaces contra infecciones estafilocócicas. También se necesitan composiciones adicionales para tratar las infecciones estafilocócicas.

Sumario de la invención

La proteína A (SpA) (SEQ ID NO: 33), una proteína de superficie anclada a la pared celular de *Staphylococcus aureus*, permite la evasión bacteriana de las respuestas inmunes innatas y adaptativas. La proteína A se une a las inmunoglobulinas en su parte Fc, interactúa con el dominio VH3 de los receptores de linfocitos B estimulando de manera inapropiada la proliferación de linfocitos B y la apoptosis, se une a los dominios A1 del factor de von Willebrand para activar la coagulación intracelular, y además se une al receptor 1 del TNF para contribuir a la patogénesis de la neumonía estafilocócica. Debido al hecho de que la proteína A captura la inmunoglobulina y muestra atributos tóxicos, no se ha seguido de manera rigurosa la posibilidad de que esta molécula de superficie pueda funcionar como una vacuna en los seres humanos. En el presente documento, los inventores demuestran que las variantes de la proteína A que ya no son capaces de unirse a las inmunoglobulinas, que se eliminan, por tanto, de su potencial toxigénico, es decir, que son no toxigénicas, estimulan respuestas inmunes humores que protegen contra enfermedades estafilocócicas.

La invención proporciona un polipéptido inmunogénico aislado que comprende un dominio D de variante de la proteína A (SpA) que tiene (a) dos sustituciones de aminoácidos que interrumpen la unión a Fc; y (b) dos sustituciones de aminoácidos que interrumpen la unión a VH3; en el que para (a) la variante de SpA comprende una sustitución del resto de glicina en cada posición de aminoácido correspondiente a las posiciones de aminoácidos 9 y 10 de SEQ ID NO: 2; y para (b) la variante de SpA comprende una sustitución del resto de serina en cada posición de aminoácido correspondiente a las posiciones de aminoácido 36 y 37 de SEQ ID NO: 2.

También se proporcionan:

- una composición inmunogénica que comprende un polipéptido de la invención en una composición farmacéuticamente aceptable;
- una vacuna que comprende el polipéptido o la composición de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable;
- una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia codificante del polipéptido de la invención;
- un método de fabricación de una vacuna que comprende las etapas de mezclar antígenos para preparar la composición de la invención y la adición de un excipiente farmacéuticamente aceptable; y
- una composición para su uso en la generación de una respuesta inmune contra una bacteria estafilocócica en un sujeto que comprende un polipéptido de la invención o una composición de la invención.

En el presente documento, se desvelan variantes de SpA de longitud completa que comprenden un dominio A, B, C, D y E de la variante. En ciertos aspectos de la divulgación, la variante de SpA comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos que es un 80, 90, 95, 98, 99 o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34. En otras realizaciones, la variante de SpA comprende un segmento de SpA. El segmento de SpA puede comprender al menos o como máximo 1, 2, 3, 4, 5 o más dominios de unión de IgG. Los dominios de IgG pueden ser al menos o como máximo 1, 2, 3, 4, 5 o más dominios A, B, C, D o E de la variante. En ciertos aspectos, la variante de SpA comprende al menos o como máximo 1, 2, 3, 4, 5 o más dominios A de la variante. En un aspecto adicional, la variante de SpA comprende al menos o como máximo 1, 2, 3, 4, 5 o más dominios B de la variante. En un aspecto adicional más, la variante de SpA comprende al menos o como máximo 1, 2, 3, 4, 5 o más dominios C de la variante. En otro aspecto adicional más, la variante de SpA comprende al menos o como máximo 1, 2, 3, 4, 5 o más dominios D de la variante. En ciertos aspectos, la variante de SpA comprende al menos o como máximo 1, 2, 3, 4, 5 o más

dominios E de la variante. En un aspecto adicional, la variante de SpA comprende una combinación de los dominios A, B, C, D y E en diversas combinaciones y permutaciones. Las combinaciones pueden incluir la totalidad o parte de un segmento del péptido señal de SpA, un segmento de la región X de SpA y/o un segmento de la señal de clasificación de SpA. En otros aspectos, la variante de SpA no incluye un segmento del péptido señal de SpA, un segmento de la región X de SpA y/o un segmento de la señal de clasificación de SpA. En ciertos aspectos de la divulgación, un dominio A de la variante comprende una sustitución de la posición o posiciones 7, 8, 34 y/o 35 de SEQ ID NO: 4. En otro aspecto, un dominio B de la variante comprende una sustitución de la posición o posiciones 7, 8, 34 y/o 35 de SEQ ID NO: 6. En otro aspecto más, un dominio C de la variante comprende una sustitución de la posición o posiciones 7, 8, 34 y/o 35 de SEQ ID NO: 5. En ciertos aspectos, un dominio D de la variante comprende una sustitución de la posición o posiciones 9, 10, 36 y/o 37 de SEQ ID NO: 2. En un aspecto adicional, un dominio E de la variante comprende una sustitución de la posición o posiciones 6, 7, 33 y/o 34 de SEQ ID NO: 3.

En ciertos aspectos de la divulgación, una variante del dominio D de SpA o su equivalente puede comprender una mutación de la posición 9 y 36; 9 y 37; 9 y 10; 36 y 37; 10 y 36; 10 y 37; 9, 36 y 37; 10, 36 y 37, 9, 10 y 36; o 9, 10 y 37 de SEQ ID NO: 2. En un aspecto adicional, se pueden incluir mutaciones análogas en uno o más de los dominios A, B, C o E.

En aspectos adicionales de la divulgación, el aminoácido glutamina (Q) de la posición 9 de SEQ ID NO: 2 (o su aminoácido análogo en otros dominios de SpA) se puede reemplazar por una alanina (A), una asparagina (N), un ácido aspártico (D), una cisteína (C), un ácido glutámico (E), una fenilalanina (F), una glicina (G), una histidina (H), una isoleucina (I), una lisina (K), una leucina (L), una metionina (M), una prolina (P), una serina (S), una treonina (T), una valina (V), un triptófano (W) o una tirosina (Y). En algunos aspectos, la glutamina de la posición 9 puede sustituirse con una arginina (R). En un aspecto adicional, la glutamina de la posición 9 de SEQ ID NO: 2, o su equivalente, puede sustituirse con una lisina o una glicina. Cualquier 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de las sustituciones se pueden excluir explícitamente.

En otro aspecto de la divulgación, el aminoácido glutamina (Q) de la posición 10 de SEQ ID NO: 2 (o su aminoácido análogo en otros dominios de SpA) se puede reemplazar por una alanina (A), una asparagina (N), un ácido aspártico (D), una cisteína (C), un ácido glutámico (E), una fenilalanina (F), una glicina (G), una histidina (H), una isoleucina (I), una lisina (K), una leucina (L), una metionina (M), una prolina (P), una serina (S), una treonina (T), una valina (V), un triptófano (W) o una tirosina (Y). En algunos aspectos, la glutamina de la posición 10 puede sustituirse con una arginina (R). En un aspecto adicional, la glutamina de la posición 10 de SEQ ID NO: 2, o su equivalente, puede sustituirse con una lisina o una glicina. Cualquier 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de las sustituciones se pueden excluir explícitamente.

En ciertos aspectos de la divulgación, el ácido aspártico (D) de la posición 36 de SEQ ID NO: 2 (o su aminoácido análogo en otros dominios de SpA) se puede reemplazar por una alanina (A), una asparagina (N), una arginina (R), una cisteína (C), una fenilalanina (F), una glicina (G), una histidina (H), una isoleucina (I), una lisina (K), una leucina (L), una metionina (M), una prolina (P), una serina (S), una treonina (T), una valina (V), un triptófano (W) o una tirosina (Y). En algunos aspectos, el ácido aspártico de la posición 36 puede sustituirse con un ácido glutámico (E). En ciertos aspectos, un ácido aspártico de la posición 36 de SEQ ID NO: 2, o su equivalente, puede sustituirse con una alanina o una serina. Cualquier 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de las sustituciones se pueden excluir explícitamente.

En otro aspecto de la divulgación, el ácido aspártico (D) de la posición 37 de SEQ ID NO: 2 (o su aminoácido análogo en otros dominios de SpA) se puede reemplazar por una alanina (A), una asparagina (N), una arginina (R), una cisteína (C), una fenilalanina (F), una glicina (G), una histidina (H), una isoleucina (I), una lisina (K), una leucina (L), una metionina (M), una prolina (P), una serina (S), una treonina (T), una valina (V), un triptófano (W) o una tirosina (Y). En algunos aspectos, el ácido aspártico de la posición 37 puede sustituirse con un ácido glutámico (E). En ciertos aspectos, un ácido aspártico de la posición 37 de SEQ ID NO: 2, o su equivalente, puede sustituirse con una alanina o una serina. Cualquier 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de las sustituciones se pueden excluir explícitamente.

En un aspecto de la divulgación, el amino de la posición 9 de SEQ ID NO: 2 (o un aminoácido análogo en otro dominio de SpA) se reemplaza por una alanina (A), una glicina (G), una isoleucina (I), una leucina (L), una prolina (P), una serina (S) o una valina (V). En ciertos aspectos, el aminoácido de la posición 9 de SEQ ID NO: 2 se reemplaza por una glicina. En un aspecto adicional, el aminoácido de la posición 9 de SEQ ID NO: 2 se reemplaza por una lisina.

En un aspecto de la divulgación, el amino de la posición 10 de SEQ ID NO: 2 (o un aminoácido análogo en otro dominio de SpA) se reemplaza por una alanina (A), una glicina (G), una isoleucina (I), una leucina (L), una prolina (P), una serina (S) o una valina (V). En ciertos aspectos, el aminoácido de la posición 10 de SEQ ID NO: 2 se reemplaza por una glicina. En un aspecto adicional, el aminoácido de la posición 10 de SEQ ID NO: 2 se reemplaza por una lisina.

En un aspecto de la divulgación, el amino de la posición 36 de SEQ ID NO: 2 (o un aminoácido análogo en otro dominio de SpA) se reemplaza por una alanina (A), una glicina (G), una isoleucina (I), una leucina (L), una prolina (P), una serina (S) o una valina (V). En ciertos aspectos, el aminoácido de la posición 36 de SEQ ID NO: 2 se reemplaza por una serina. En un aspecto adicional, el aminoácido de la posición 36 de SEQ ID NO: 2 se reemplaza por una alanina.

En un aspecto de la divulgación, el amino de la posición 37 de SEQ ID NO: 2 (o un aminoácido análogo en otro dominio de SpA) se reemplaza por una alanina (A), una glicina (G), una isoleucina (I), una leucina (L), una prolina (P), una serina (S) o una valina (V). En ciertos aspectos, el aminoácido de la posición 37 de SEQ ID NO: 2 se reemplaza por una serina. En un aspecto adicional, el aminoácido de la posición 37 de SEQ ID NO: 2 se reemplaza por una alanina.

En ciertos aspectos de la divulgación, la variante de SpA incluye una sustitución de (a) una o más sustituciones de aminoácidos en un subdominio de unión a Fc de IgG del dominio A, B, C, D y/o E de SpA que interrumpe o disminuye la unión a Fc de IgG; y (b) una o más sustituciones de aminoácidos en un subdominio de unión a V_H3 del dominio A, B, C, D y/o E de SpA que interrumpe o disminuye la unión a V_H3. En otros aspectos más, la secuencia de aminoácidos de una variante de SpA comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % idéntica, incluyendo todos los valores e intervalos existentes entre ellos, a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2-6.

En un aspecto adicional de la divulgación, la variante de SpA incluye (a) una o más sustituciones de aminoácidos en un subdominio de unión a Fc de IgG del dominio D de SpA, o en una posición de aminoácido correspondiente de otros dominios de IgG, que interrumpe o disminuye la unión a Fc de IgG; y (b) una o más sustituciones de aminoácidos en un subdominio de unión a V_H3 del dominio D de SpA, o en una posición de aminoácido correspondiente de otros dominios de IgG, que interrumpe o disminuye la unión a V_H3. En ciertos aspectos de la divulgación, los restos de aminoácidos F5, Q9, Q10, S11, F13, Y14, L17, N28, I31 y/o K35 (SEQ ID NO: 2, QQNNFNKDQQSAFYEILNMPNLNEAQRNGFIQSLKDDPSQSTNVLGEAKKLNES) del subdominio de unión a Fc de IgG del dominio D están modificados o sustituidos. En ciertos aspectos, los restos de aminoácido Q26, G29, F30, S33, D36, D37, Q40, N43 y/o E47 (SEQ ID NO: 2) del subdominio de unión a V_H3 del dominio D están modificados o sustituidos de manera que la unión a Fc o V_H3 está atenuada. En aspectos adicionales, las modificaciones o sustituciones correspondientes pueden diseñarse en las posiciones correspondientes del dominio A, B, C y/o E. Las posiciones correspondientes se definen mediante la alineación de la secuencia de aminoácidos del dominio D con una o más de las secuencias de aminoácidos de otros dominios de unión a IgG de SpA, por ejemplo, véase la FIG. 2A. En ciertos aspectos, la sustitución de aminoácidos puede ser cualquiera de los otros 20 aminoácidos. En un aspecto adicional, las sustituciones de aminoácidos conservativas pueden excluirse específicamente de posibles sustituciones de aminoácidos. En otros aspectos, solo se incluyen sustituciones no conservativas. En cualquier caso, se contempla cualquier sustitución o combinación de sustituciones que reduzca la unión del dominio de modo que la toxicidad de SpA se reduzca significativamente. La importancia de la reducción en la unión se refiere a una variante que produce una toxicidad mínima o nula cuando se introduce en un sujeto y puede evaluarse usando métodos *in vitro* descritos en el presente documento.

En ciertas realizaciones, una variante de SpA comprende al menos o como máximo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más péptidos del dominio D de la variante de SpA. En ciertos aspectos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19 o más restos de aminoácidos de la variante de SpA se sustituyen o modifican – incluyendo, pero sin limitación, los aminoácidos F5, Q9, Q10, S11, F13, Y14, L17, N28, I31 y/o K35 (SEQ ID NO: 2) del subdominio de unión a Fc de la IgG del dominio D, y el resto de aminoácido Q26, G29, F30, S33, D36, D37, Q40, N43 y/o E47 (SEQ ID NO: 2) del subdominio de unión a V_H3 del dominio D. En un aspecto de la divulgación, los restos de glutamina de la posición 9 y/o 10 de SEQ ID NO: 2 (o las posiciones correspondientes en otros dominios) están mutados. En otro aspecto de la divulgación, los restos de ácido aspártico 36 y/o 37 de SEQ ID NO: 2 (o las posiciones correspondientes de otros dominios) están mutados. En la invención, la glutamina 9 y 10, y los restos de ácido aspártico 36 y 37 están mutados. Los mutantes/variantes de SpA o SpA-D no toxigénicos purificados descritos en el presente documento ya no son capaces de unirse significativamente (es decir, demuestran una afinidad de unión atenuada o interrumpida) a V_H3 de Fcγ o F(ab)₂ y tampoco estimulan la apoptosis de los linfocitos B. Estas variantes de proteína A no toxigénicas se pueden usar como vacunas de subunidades y elevar las respuestas inmunes humorales y conferir inmunidad protectora contra la exposición a *S. aureus*. En comparación con la proteína A de longitud completa de tipo silvestre o el dominio D de SpA de tipo silvestre, la inmunización con variantes de SpA-D dio produjo un aumento en el anticuerpo específico de la proteína A. Usando un modelo de ratón de exposición a estafilococos y de formación de abscesos, se observó que la inmunización con las variantes de proteína A no toxigénicas generaba una protección significativa contra la infección por estafilococos y la formación de abscesos. Como casi todas las cepas de *S. aureus* expresan la proteína A, la inmunización de los seres humanos con las variantes no toxigénicas de la proteína A pueden neutralizar este factor de virulencia y, de esta manera, establecer inmunidad protectora. En ciertos aspectos, la inmunidad protectora protege de o mejora la infección por cepas de estafilococos resistentes a fármacos, tales como la USA300 y otras cepas de MRSA.

Las realizaciones incluyen el uso de las variantes de la proteína A en composiciones para el tratamiento de infecciones bacterianas y/o estafilocócicas. La presente solicitud también proporciona una composición

inmunogénica que comprende una variante de la proteína A o un fragmento inmunogénico de la misma. En ciertos aspectos, el fragmento inmunogénico es un segmento del dominio D de la proteína A. Además, la presente invención proporciona composiciones que se pueden usar para tratar (por ejemplo, limitar la formación y/o persistencia de abscesos estafilocócicos en un sujeto) o prevenir una infección bacteriana. En algunos casos, los métodos para estimular una respuesta inmune implican administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que incluye o codifica la totalidad o parte de un polipéptido o antígeno de la variante de la proteína A, y en ciertos aspectos otras proteínas bacterianas. Otras proteínas bacterianas incluyen, pero sin limitación, (i) un factor de virulencia secretado y/o una proteína o un péptido de la superficie celular; o (ii) una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica un factor de virulencia secretado y/o una proteína o un péptido de la superficie celular.

En otros aspectos, se puede administrar al sujeto la totalidad o parte de una variante de la proteína A, tal como un segmento del dominio D de la variante de la proteína A. El polipéptido de la invención puede formularse en una composición farmacéuticamente aceptable. La composición puede comprender además uno o más de al menos o como máximo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19 antígenos estafilocócicos adicionales o un fragmento inmunogénico de los mismos (por ejemplo, Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla (por ejemplo, mutantes H35), IsdC, SasF, vWbp o vWh). Los antígenos estafilocócicos adicionales que se pueden usar en combinación con una variante de la proteína A incluyen, pero sin limitación, la proteína de unión a vitronectina de 52 kDa (documento WO 01/60852), Aaa (GenBank CAC80837), Aap (nº de acceso del GenBank AJ249487), Ant (número de acceso del GenBank NP_372518), autolisina glucosaminidasa, autolisina amidasa, Cna, proteína de unión a colágeno (documento US6288214), EFB (FIB), proteína de unión a elastina (EbpS), EPB, FbpA, proteína de unión a fibrinógeno (documento US6008341), proteína de unión a fibronectina (documento US5840846), FnbA, FnbB, GehD (documento US 2002/0169288), HarA, HBP, transportador ABC inmunodominante, IsaA/PisA, receptor de laminina, Lipasa GehD, MAP, transportador de Mg^{2+} , análogo de MHC II (documento US5648240), MRPII, Npasa, proteína activadora del ARN III (RAP), SasA, SasB, SasC, SasD, SasK, SBI, SdrF (documento WO 00/12689), SdrG/Fig (documento WO 00/12689), SdrH (documento WO 00/12689), exotoxinas SEA (documento WO 00/02523), exotoxinas SEB (documento WO 00/02523), transportador ABC de SitC y Ni, proteína de unión a SitC/MntC/saliva (documento US5.801.234), SsaA, SSP-1, SSP-2 y/o proteína de unión a Vitronectina (véase las publicaciones PCT documentos WO2007/113222, WO2007/113223, WO2006/032472, WO2006/032475, WO2006/032500). El antígeno estafilocócico o fragmento inmunogénico se puede administrar de forma concurrente con la variante de la proteína A. El antígeno estafilocócico o fragmento inmunogénico y la variante de la proteína A se puede administrar en la misma composición. La variante de la proteína A además puede ser una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica una variante de la proteína A. Una molécula de ácido nucleico recombinante puede codificar la variante de la proteína A y al menos un antígeno estafilocócico o un fragmento inmunogénico del mismo. Como se usa en el presente documento, el término “modular” o “modulación” abarca los significados de las palabras “aumentar” o “inhibir”. La “modulación” de la actividad puede ser tanto un aumento como una disminución de la actividad. Como se usa en el presente documento, el término “modulador” se refiere a compuestos que efectúan la función de una fracción, incluyendo la regulación positiva, la inducción, la estimulación, la potenciación, inhibición, regulación negativa o supresión de una proteína, ácido nucleico, gen, organismo o similar.

En ciertas realizaciones los métodos y las composiciones usan o incluyen o codifican la totalidad o parte del antígeno o de la variante de la proteína A. En otros aspectos, la variante de la proteína A se puede usar en combinación con factores secretados o antígenos de superficie incluyendo, pero sin limitación, uno o más de un polipéptido Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp o vWh aislado o segmento inmunogénico del mismo. Los antígenos estafilocócicos adicionales que se pueden usar en combinación con una variante de la proteína A incluyen, pero sin limitación, la proteína de unión a vitronectina de 52 kDa (documento WO 01/60852), Aaa, Aap, Ant, autolisina glucosaminidasa, autolisina amidasa, Cna, proteína de unión a colágeno (documento US6288214), EFB (FIB), proteína de unión a elastina (EbpS), EPB, FbpA, proteína de unión a fibrinógeno (documento US6008341), proteína de unión a fibronectina (documento US5840846), FnbA, FnbB, GehD (documento US 2002/0169288), HarA, HBP, transportador ABC inmunodominante, IsaA/PisA, receptor de laminina, Lipasa GehD, MAP, transportador de Mg^{2+} , análogo de MHC II (documento US5648240), MRPII, Npasa, proteína activadora del ARN III (RAP), SasA, SasB, SasC, SasD, SasK, SBI, SdrF (documento WO 00/12689), SdrG/Fig (documento WO 00/12689), SdrH (documento WO 00/12689), exotoxinas SEA (documento WO 00/02523), exotoxinas SEB (documento WO 00/02523), transportador ABC de SitC y Ni, proteína de unión a SitC/MntC/saliva (documento US5.801.234), SsaA, SSP-1, SSP-2 y/o proteína de unión a Vitronectina. En ciertas realizaciones, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp, vWh, proteína de unión a vitronectina de 52 kDa (documento WO 01/60852), Aaa, Aap, Ant, autolisina glucosaminidasa, autolisina amidasa, Cna, proteína de unión al colágeno (documento US6288214), EFB (FIB), proteína de unión a la elastina (EbpS), EPB, FbpA, proteína de unión al fibrinógeno (documento US6008341), proteína de unión a la fibronectina (documento US5840846), FnbA, FnbB, GehD (documento US 2002/0169288), HarA, HBP, transportador ABC inmunodominante, IsaA/PisA, receptor de laminina, Lipasa GehD, MAP, transportador de Mg^{2+} , análogo de MHC II (documento US5648240), MRPII, Npasa, proteína activadora de ARN III (RAP), SasA, SasB, SasC, SasD, SasK, SBI, SdrF (documento WO 00/12689), SdrG / Fig (documento WO 00/12689), SdrH (documento WO 00/12689), exotoxinas SEA (documento WO 00/02523), exotoxinas SEB (documento WO 00/02523), transportador ABC de SitC y Ni, proteína de unión a SitC/MntC/saliva (documento US5.801.234), SsaA, SSP-1, SSP-2 y/o proteína de unión a Vitronectina se pueden excluir

específicamente de una formulación de la invención.

La siguiente tabla enumera las diversas combinaciones de variantes de SpA y los otros diversos antígenos estafilocócicos.

5

Tabla 1. Combinaciones de SpA y antígenos estafilocócicos

Eap	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ebh		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Emp			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsaB				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsaC					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsxA						+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsxB							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrC								+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrD									+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrE										+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdA											+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdB												+	+	+	+	+	+	+	+	+
ClfA													+	+	+	+	+	+	+	+
ClfB														+	+	+	+	+	+	+
Coa															+	+	+	+	+	+
Hla																+	+	+	+	+
Hla _{H35A}																	+	+	+	+
IsdC																	+	+	+	+
SasF																		+	+	+
vWbp																			+	+
vWh																				+
Ebh			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Emp				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsaB					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsaC						+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsxA							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsxB								+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrC									+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrD										+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrE											+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdA												+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdB													+	+	+	+	+	+	+	+
ClfA														+	+	+	+	+	+	+
ClfB															+	+	+	+	+	+
Coa																+	+	+	+	+

ES 2 655 701 T3

Hla																	+	+	+	+	+	+
Hla _{H35A}																		+	+	+	+	+
IsdC																			+	+	+	+
SasF																				+	+	+
vWbp																					+	+
vWh																						+
Emp				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsaB					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsaC						+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsxA							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsxB								+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrC									+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrD										+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrE											+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdA												+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdB													+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ClfA														+	+	+	+	+	+	+	+	+
ClfB															+	+	+	+	+	+	+	+
Coa																+	+	+	+	+	+	+
Hla																		+	+	+	+	+
Hla _{H35A}																			+	+	+	+
IsdC																				+	+	+
SasF																					+	+
vWbp																					+	+
vWh																						+
EsaB					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsaC						+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsxA							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsxB								+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrC									+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrD										+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrE											+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdA												+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdB													+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ClfA														+	+	+	+	+	+	+	+	+
ClfB															+	+	+	+	+	+	+	+
Coa																+	+	+	+	+	+	+
Hla																	+	+	+	+	+	+

ES 2 655 701 T3

Hla _{H35A}																		+	+	+	+	+
IsdC																			+	+	+	+
SasF																				+	+	+
vWbp																					+	+
vWh																						+
EsaC						+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsxA							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsxB								+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrC									+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrD										+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrE											+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdA													+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdB														+	+	+	+	+	+	+	+	+
ClfA															+	+	+	+	+	+	+	+
ClfB																+	+	+	+	+	+	+
Coa																	+	+	+	+	+	+
Hla																		+	+	+	+	+
Hla _{H35A}																			+	+	+	+
IsdC																				+	+	+
SasF																					+	+
vWbp																						+
vWh																						+
EsxA							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsxB								+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrC									+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrD										+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrE											+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdA												+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdB													+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ClfA														+	+	+	+	+	+	+	+	+
ClfB															+	+	+	+	+	+	+	+
Coa																+	+	+	+	+	+	+
Hla																	+	+	+	+	+	+
Hla _{H35A}																		+	+	+	+	+
IsdC																			+	+	+	+
SasF																				+	+	+
vWbp																					+	+
vWh																						+

ES 2 655 701 T3

EsxB								+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrC									+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrD										+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrE											+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdA												+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdB													+	+	+	+	+	+	+	+	+
ClfA														+	+	+	+	+	+	+	+
ClfB															+	+	+	+	+	+	+
Coa																+	+	+	+	+	+
Hla																	+	+	+	+	+
Hla _{H35A}																		+	+	+	+
IsdC																			+	+	+
SasF																				+	+
vWbp																					+
vWh																					+
SdrC										+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrD											+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrE												+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdA													+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdB														+	+	+	+	+	+	+	+
ClfA															+	+	+	+	+	+	+
ClfB																+	+	+	+	+	+
Coa																	+	+	+	+	+
Hla																		+	+	+	+
Hla _{H35A}																			+	+	+
IsdC																				+	+
SasF																					+
vWbp																					+
vWh																					+
SdrD												+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrE													+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdA														+	+	+	+	+	+	+	+
IsdB															+	+	+	+	+	+	+
ClfA																+	+	+	+	+	+
ClfB																	+	+	+	+	+
Coa																		+	+	+	+
Hla																			+	+	+
Hla _{H35A}																				+	+

ES 2 655 701 T3

IsdC																			+	+	+	+
SasF																				+	+	+
vWbp																					+	+
vWh																						+
SdrE										+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdA											+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdB												+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ClfA													+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ClfB														+	+	+	+	+	+	+	+	+
Coa															+	+	+	+	+	+	+	+
Hla																+	+	+	+	+	+	+
Hla _{H35A}																	+	+	+	+	+	+
IsdC																		+	+	+	+	+
SasF																				+	+	+
vWbp																					+	+
vWh																						+
IsdA												+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdB													+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ClfA														+	+	+	+	+	+	+	+	+
ClfB															+	+	+	+	+	+	+	+
Coa																+	+	+	+	+	+	+
Hla																	+	+	+	+	+	+
Hla _{H35A}																		+	+	+	+	+
IsdC																			+	+	+	+
SasF																				+	+	+
vWbp																					+	+
vWh																						+
IsdB														+	+	+	+	+	+	+	+	+
ClfA															+	+	+	+	+	+	+	+
ClfB																+	+	+	+	+	+	+
Coa																	+	+	+	+	+	+
Hla																		+	+	+	+	+
Hla _{H35A}																			+	+	+	+
IsdC																				+	+	+
SasF																					+	+
vWbp																					+	+
vWh																						+

ClfA														+	+	+	+	+	+	+
ClfB															+	+	+	+	+	+
Coa																+	+	+	+	+
Hla																	+	+	+	+
Hla _{H35A}																		+	+	+
IsdC																		+	+	+
SasF																			+	+
vWbp																				+
vWh																				+
ClfB															+	+	+	+	+	+
Coa																+	+	+	+	+
Hla																	+	+	+	+
Hla _{H35A}																		+	+	+
IsdC																		+	+	+
SasF																			+	+
vWbp																				+
vWh																				+
Coa																+	+	+	+	+
Hla																	+	+	+	+
Hla _{H35A}																		+	+	+
IsdC																		+	+	+
SasF																			+	+
vWbp																				+
vWh																				+
Hla																	+	+	+	+
Hla _{H35A}																		+	+	+
IsdC																		+	+	+
SasF																			+	+
vWbp																				+
vWh																				+
Hla _{H35A}																		+	+	+
IsdC																		+	+	+
SasF																			+	+
vWbp																				+
vWh																				+

IsdC																		+	+	+	+
SasF																			+	+	+
vWbp																				+	+
vWh																					+
SasF																			+	+	+
vWbp																				+	+
vWh																					+
vWbp																				+	+
vWh																					+
vWh																					+

En realizaciones adicionales, la variante de la proteína A aislada se multimeriza, por ejemplo, se dimeriza en una fusión lineal de dos o más polipéptidos o segmentos peptídicos. En ciertos aspectos de la invención, una composición comprende multímeros o concatámeros de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más proteínas de la superficie celular aisladas o segmentos de las mismas. Los concatámeros son polipéptidos lineales que tienen una o más unidades peptídicas de repetición. Los polipéptidos o fragmentos de SpA pueden ser consecutivos o estar separados mediante un espaciador u otras secuencias peptídicas, por ejemplo, uno o más péptidos bacterianos adicionales. En una realización adicional, los demás polipéptidos o péptidos contenidos en el multímero o concatámero pueden incluir, pero sin limitación, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 de Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp, vWh o fragmentos inmunogénicos de los mismos. Los antígenos estafilocócicos adicionales que se pueden usar en combinación con una variante de la proteína A incluyen, pero sin limitación, la proteína de unión a vitronectina de 52 kDa (documento WO 01/60852), Aaa, Aap, Ant, autolisina glucosaminidasa, autolisina amidasa, Cna, proteína de unión a colágeno (documento US6288214), EFB (FIB), proteína de unión a elastina (EbpS), EPB, FbpA, proteína de unión a fibrinógeno (documento US6008341), proteína de unión a fibronectina (documento US5840846), FnbA, FnbB, GehD (documento US 2002/0169288), HarA, HBP, transportador ABC inmunodominante, IsaA/PisA, receptor de laminina, Lipasa GehD, MAP, transportador de Mg²⁺, análogo de MHC II (documento US5648240), MRPII, Npasa, proteína activadora del ARN III (RAP), SasA, SasB, SasC, SasD, SasK, SBI, SdrF (documento WO 00/12689), SdrG/Fig (documento WO 00/12689), SdrH (documento WO 00/12689), exotoxinas SEA (documento WO 00/02523), exotoxinas SEB (documento WO 00/02523), transportador ABC de SitC y Ni, proteína de unión a SitC/MntC/saliva (documento US5.801.234), SsaA, SSP-1, SSP-2 y/o proteína de unión a Vitronectina.

El término “variante de la proteína A” o “variante de la SpA” se refiere a polipéptidos que incluyen un dominio de la IgG de SpA que tiene dos o más sustituciones de aminoácidos que interrumpen la unión a Fc y a V_H3. En un cierto aspecto, la variante de SpA incluye un péptido de dominio D de la variante, así como variantes de polipéptidos de SpA y segmentos de las mismas que son no toxigénicos y que estimulan una respuesta inmune contra la proteína A de las bacterias estafilocócicas y/o bacterias que las expresan.

Las realizaciones de la presente invención incluyen composiciones para su uso en la generación de una respuesta inmune contra una bacteria estafilococo o estafilococos en un sujeto, que comprende proporcionar al sujeto una cantidad eficaz de una variante de la proteína A o un segmento de la misma. En ciertas realizaciones, las composiciones para su uso en la generación de una respuesta inmune contra una bacteria estafilococo o estafilococos en un sujeto son para su uso en un método que comprende proporcionar al sujeto una cantidad eficaz de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o más proteínas secretadas y/o proteínas de la superficie celular o segmentos/fragmentos de las mismas. Una proteína secretada o proteína de la superficie celular incluye, pero sin limitación, las proteínas Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp y/o vWh, y los fragmentos inmunogénicos de las mismas. Los antígenos estafilocócicos adicionales que se pueden usar en combinación con una variante de la proteína A incluyen, pero sin limitación, la proteína de unión a vitronectina de 52 kDa (documento WO 01/60852), Aaa, Aap, Ant, autolisina glucosaminidasa, autolisina amidasa, Cna, proteína de unión a colágeno (documento US6288214), EFB (FIB), proteína de unión a elastina (EbpS), EPB, FbpA, proteína de unión a fibrinógeno (documento US6008341), proteína de unión a fibronectina (documento US5840846), FnbA, FnbB, GehD (documento US 2002/0169288), HarA, HBP, transportador ABC inmunodominante, IsaA/PisA, receptor de laminina, Lipasa GehD, MAP, transportador de Mg²⁺, análogo de MHC II (documento US5648240), MRPII, Npasa, proteína activadora del ARN III (RAP), SasA, SasB,

SasC, SasD, SasK, SBI, SdrF (documento WO 00/12689), SdrG/Fig (documento WO 00/12689), SdrH (documento WO 00/12689), exotoxinas SEA (documento WO 00/02523), exotoxinas SEB (documento WO 00/02523), transportador ABC de SitC y Ni, proteína de unión a SitC/MntC/saliva (documento US5.801.234), SsaA, SSP-1, SSP-2 y/o proteína de unión a Vitronectina.

Aspectos de la divulgación incluyen composiciones que incluyen un polipéptido, un péptido o una proteína que es o que al menos es un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica o similar a la proteína A, o una segunda proteína o péptido que es una proteína bacteriana secretada o una proteína de la superficie celular bacteriana. En un aspecto adicional de la divulgación, una composición puede incluir un polipéptido, un péptido o una proteína que sea o que sea al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a un polipéptido del dominio D (SEQ ID NO: 2), del dominio E (SEQ ID NO: 3), del dominio A (SEQ ID NO: 4), del dominio C (SEQ ID NO: 5), del dominio B (SEQ ID NO: 6) de la proteína A, o a una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido del dominio D, dominio E, dominio A, dominio C o dominio B de la proteína A. En ciertos aspectos, un segmento de polipéptido de proteína A tendrá una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8. En la técnica, se conoce la similitud o la identidad, siendo preferida la identidad, y se puede usar una serie de diferentes programas para identificar si una proteína (o un ácido nucleico) tiene identidad o similitud de secuencia con respecto a una secuencia conocida. La identidad y/o similitud de las secuencias se determina usando técnicas convencionales conocidas en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, el algoritmo de identidad de secuencias de Smith y Waterman (1981), mediante el algoritmo de alineación de identidad de la secuencia de Needleman y Wunsch (1970), mediante el método de búsqueda de similitudes de Pearson y Lipman (1988), mediante implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics, de Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.), el programa de secuencias Best Fit descrito por Devereux *et al.* (1984), preferentemente usando los ajustes por defecto, o mediante inspección. Preferentemente, el porcentaje de identidad se calcula usando herramientas de alineamiento conocidas, y fácilmente verificables, por los expertos en la materia. El porcentaje de identidad es esencialmente el número de aminoácidos idénticos dividido entre el número total de aminoácidos multiplicado por cien.

Otras realizaciones adicionales incluyen composiciones para su uso en métodos para estimular en un sujeto una respuesta inmune protectora o terapéutica contra una bacteria estafilocócica que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que incluye (i) una variante de SpA, por ejemplo, un polipéptido de dominio D de la variante de SpA o un péptido del mismo; o, (ii) administrar un polipéptido de dominio D de la variante de SpA con cualquier combinación o permutación de proteínas bacterianas descritas en el presente documento. En una realización preferida, la composición no es una bacteria estafilocócica. En ciertos aspectos, el sujeto es un ser humano o una vaca. En un aspecto adicional, la composición se formula en una formulación farmacéuticamente aceptable. Los estafilococos pueden ser *Staphylococcus aureus*.

Todavía otras realizaciones adicionales incluyen vacunas que comprenden una composición farmacéuticamente aceptable que tiene un polipéptido variante de SpA aislado, en las que la composición es capaz de estimular una respuesta inmune contra una bacteria estafilocócica. La vacuna comprende un polipéptido variante de SpA aislado descrito en el presente documento. En ciertos aspectos de la invención, el polipéptido variante de SpA aislado, o cualquier otra combinación o permutación de proteína/s o péptido/s descrito/s se multimerizan, por ejemplo, se dimerizan o se concamerizan. En un aspecto adicional, la composición de vacuna está contaminada por menos de aproximadamente 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,05 % (o cualquier intervalo derivable de los mismos) de otras proteínas estafilocócicas. Una composición puede comprender además un polipéptido de SpA no aislado. Por lo general, la vacuna comprende un adyuvante. En ciertos aspectos, una proteína o un péptido de la invención se enlaza (covalente o no covalentemente) al adyuvante, preferentemente, el adyuvante se conjuga químicamente con la proteína.

En otros aspectos adicionales más de la divulgación, una composición de vacuna es una composición farmacéuticamente aceptable que tiene un ácido nucleico recombinante que codifica todo o parte de un polipéptido variante de SpA, o cualquier otra combinación o permutación de proteína/s o péptido/s descrito/s en el presente documento, en la que la composición es capaz de estimular una respuesta inmune contra una bacteria estafilocócica. La composición de vacuna puede comprender un ácido nucleico recombinante que codifica todo o parte de un polipéptido variante de SpA, o cualquier otra combinación o permutación de proteína/s o péptido/s descrito/s en el presente documento. En ciertos aspectos, el ácido nucleico recombinante contiene un promotor heterólogo. Preferentemente, el ácido nucleico recombinante es un vector. Más preferentemente, el vector es un plásmido o un vector vírico. En algunos aspectos, la vacuna incluye una bacteria recombinante no estafilocócica que contiene el ácido nucleico. Los no estafilococos recombinantes pueden ser *Salmonella* u otras bacterias gram-positivas. La vacuna puede comprender un excipiente farmacéuticamente aceptable, más preferentemente un adyuvante.

Otras realizaciones adicionales incluyen composiciones para su uso en métodos de estimulación, en un sujeto, de una respuesta inmune protectora o terapéutica contra una bacteria estafilocócica que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición de un polipéptido variante de SpA y que comprende además una o más de una proteína Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, VWbp o VWb, o péptido de la misma. En una realización preferida, la composición comprende una

- bacteria no estafilocócica. En una realización adicional, la composición se formula en una formulación farmacéuticamente aceptable. Los estafilococos para los que se está tratando al sujeto pueden ser *Staphylococcus aureus*. Las realizaciones de la invención también incluyen composiciones de variantes de SpA que contienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o más factores de virulencia secretados y/o proteínas de superficie celular, tales como Eap, Ebh, Emp, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp o vWh en diversas combinaciones. En ciertos aspectos, una formulación de vacuna incluye Eap, Ebh, Emp, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp y vWh. En ciertas realizaciones, una combinación de antígeno puede incluir (1) una variante de SpA e IsdA; (2) variante de SpA y ClfB; (3) variante de SpA y SdrD; (4) variante de SpA y variante Hla o Hla; (5) variante de SpA y ClfB, SdrD, y la variante Hla o Hla; (6) Variante de SpA, IsdA, SdrD, y variante Hla o Hla; (7) variante de SpA, IsdA, ClfB, y variante Hla o Hla; (8) variante de SpA, IsdA, ClfB y SdrD; (9) variante de SpA, IsdA, ClfB, SdrD, y la variante Hla o Hla; (10) variante de SpA, IsdA, ClfB y SdrD; (11) variante de SpA, IsdA, SdrD, y variante Hla o Hla; (12) variante de SpA, IsdA, y variante Hla o Hla; (13) variante de SpA, IsdA, ClfB, y variante Hla o Hla; (14) variante de SpA, ClfB y SdrD; (15) variante de SpA, ClfB, y variante Hla o Hla; o (16) variante de SpA, SdrD, y la variante Hla o Hla.
- En ciertos aspectos, una bacteria que administra una composición de la invención estará limitada o atenuada con respecto al crecimiento prolongado o persistente o a la formación de abscesos. En otro aspecto más, la/s variante/s de SpA pueden sobreexpresarse en una bacteria atenuada para potenciar o complementar además una respuesta inmune o una formulación de vacuna.
- La expresión "proteína EsxA" se refiere a una proteína que incluye polipéptidos EsxA de tipo silvestre aislados de bacterias estafilocócicas y segmentos de los mismos, así como variantes que estimulan una respuesta inmune contra las proteínas EsxA de las bacterias estafilocócicas.
- La expresión "proteína EsxB" se refiere a una proteína que incluye polipéptidos EsxB de tipo silvestre aislados de bacterias estafilocócicas y segmentos de los mismos, así como variantes que estimulan una respuesta inmune contra las proteínas EsxB de las bacterias estafilocócicas.
- La expresión "proteína SdrD" se refiere a una proteína que incluye polipéptidos SdrD de tipo silvestre aislados de bacterias estafilocócicas y segmentos de los mismos, así como variantes que estimulan una respuesta inmune contra las proteínas SdrD de las bacterias estafilocócicas.
- La expresión "proteína SdrE" se refiere a una proteína que incluye polipéptidos SdrE de tipo silvestre aislados de bacterias estafilocócicas y segmentos de los mismos, así como variantes que estimulan una respuesta inmune contra las proteínas SdrE de las bacterias estafilocócicas.
- La expresión "proteína IsdA" se refiere a una proteína que incluye polipéptidos IsdA de tipo silvestre aislados de bacterias estafilocócicas y segmentos de los mismos, así como variantes que estimulan una respuesta inmune contra las proteínas IsdA de las bacterias estafilocócicas.
- La expresión "proteína IsdB" se refiere a una proteína que incluye polipéptidos IsdB de tipo silvestre aislados de bacterias estafilocócicas y segmentos de los mismos, así como variantes que estimulan una respuesta inmune contra las proteínas IsdB de las bacterias estafilocócicas.
- La expresión "proteína Eap" se refiere a una proteína que incluye polipéptidos Eap de tipo silvestre aislados de bacterias estafilocócicas y segmentos de los mismos, así como variantes que estimulan una respuesta inmune contra las proteínas Eap de las bacterias estafilocócicas.
- La expresión "proteína Ebh" se refiere a una proteína que incluye polipéptidos Ebh de tipo silvestre aislados de bacterias estafilocócicas y segmentos de los mismos, así como variantes que estimulan una respuesta inmune contra las proteínas Ebh de las bacterias estafilocócicas.
- La expresión "proteína Emp" se refiere a una proteína que incluye polipéptidos Emp de tipo silvestre aislados de bacterias estafilocócicas y segmentos de los mismos, así como variantes que estimulan una respuesta inmune contra las proteínas Emp de las bacterias estafilocócicas.
- La expresión "proteína EsaB" se refiere a una proteína que incluye polipéptidos EsaB de tipo silvestre aislados de bacterias estafilocócicas y segmentos de los mismos, así como variantes que estimulan una respuesta inmune contra las proteínas EsaB de las bacterias estafilocócicas.
- La expresión "proteína EsaC" se refiere a una proteína que incluye polipéptidos EsaC de tipo silvestre aislados de bacterias estafilocócicas y segmentos de los mismos, así como variantes que estimulan una respuesta inmune contra las proteínas EsaC de las bacterias estafilocócicas.
- La expresión "proteína SdrC" se refiere a una proteína que incluye polipéptidos SdrC de tipo silvestre aislados de bacterias estafilocócicas y segmentos de los mismos, así como variantes que estimulan una respuesta inmune

contra las proteínas SdrC de las bacterias estafilocócicas.

La expresión "proteína ClfA" se refiere a una proteína que incluye polipéptidos ClfA de tipo silvestre aislados de bacterias estafilocócicas y segmentos de los mismos, así como variantes que estimulan una respuesta inmune contra las proteínas ClfA de las bacterias estafilocócicas.

La expresión "proteína ClfB" se refiere a una proteína que incluye polipéptidos ClfB de tipo silvestre aislados de bacterias estafilocócicas y segmentos de los mismos, así como variantes que estimulan una respuesta inmune contra las proteínas ClfB de las bacterias estafilocócicas.

La expresión "proteína Coa" se refiere a una proteína que incluye polipéptidos Coa de tipo silvestre aislados de bacterias estafilocócicas y segmentos de los mismos, así como variantes que estimulan una respuesta inmune contra las proteínas Coa de las bacterias estafilocócicas.

La expresión "proteína Hla" se refiere a una proteína que incluye polipéptidos Hla de tipo silvestre aislados de bacterias estafilocócicas y segmentos de los mismos, así como variantes que estimulan una respuesta inmune contra las proteínas Hla de las bacterias estafilocócicas.

La expresión "proteína IsdC" se refiere a una proteína que incluye polipéptidos IsdC de tipo silvestre aislados de bacterias estafilocócicas y segmentos de los mismos, así como variantes que estimulan una respuesta inmune contra las proteínas IsdC de las bacterias estafilocócicas.

La expresión "proteína SasF" se refiere a una proteína que incluye polipéptidos SasF de tipo silvestre aislados de bacterias estafilocócicas y segmentos de los mismos, así como variantes que estimulan una respuesta inmune contra las proteínas SasF de las bacterias estafilocócicas.

La expresión "proteína vWbp" se refiere a una proteína que incluye polipéptidos vWbp (proteína de unión al factor de von Willebrand) de tipo silvestre aislados de bacterias estafilocócicas y segmentos de los mismos, así como variantes que estimulan una respuesta inmune contra las proteínas vWbp de las bacterias estafilocócicas.

La expresión "proteína vWh" se refiere a una proteína que incluye polipéptidos vWh (homólogo de la proteína de unión al factor de von Willebrand) de tipo silvestre aislados de bacterias estafilocócicas y segmentos de los mismos, así como variantes que estimulan una respuesta inmune contra las proteínas vWh de las bacterias estafilocócicas.

Una respuesta inmune se refiere a una respuesta humoral, a una respuesta celular o a una respuesta tanto humoral como celular en un organismo. Una respuesta inmune se puede medir mediante ensayos que incluyen, pero sin limitación, ensayos que miden la presencia o la cantidad de anticuerpos que reconocen de forma específica una proteína o una proteína de la superficie celular, ensayos que miden la activación o proliferación de linfocitos T, y/o ensayos que miden la modulación en términos de la actividad o la expresión de una o más citocinas.

En aspectos adicionales más de la divulgación, una composición puede incluir un polipéptido, un péptido o una proteína que sea o sea al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una proteína EsxA. En ciertos aspectos, la proteína EsxA tendrá toda o una parte de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

En aspectos adicionales más de la divulgación, una composición puede incluir un polipéptido, un péptido o una proteína que sea o sea al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una proteína EsxB. En ciertos aspectos, la proteína EsxB tendrá toda o una parte de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

En aspectos adicionales más de la divulgación, una composición puede incluir un polipéptido, un péptido o una proteína que sea o sea al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una proteína SdrD. En ciertos aspectos, la proteína SdrD tendrá toda o una parte de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.

En aspectos adicionales más de la divulgación, una composición puede incluir un polipéptido, un péptido o una proteína que sea o sea al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una proteína SdrE. En ciertos aspectos, la proteína SdrE tendrá toda o una parte de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

En aspectos adicionales más de la divulgación, una composición puede incluir un polipéptido, un péptido o una proteína que sea o sea al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una proteína IsdA. En ciertos aspectos, la proteína IsdA tendrá toda o una parte de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.

En aspectos adicionales más de la divulgación, una composición puede incluir un polipéptido, un péptido o una proteína que sea o sea al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una proteína IsdB. En ciertos aspectos, la proteína IsdB tendrá toda o una parte de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16.

En aspectos adicionales más de la divulgación, una composición puede incluir un polipéptido, un péptido o una proteína que sea o sea al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una proteína EsaB. En ciertos aspectos, la proteína EsaB tendrá toda o una parte de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17.

En aspectos adicionales más de la divulgación, una composición puede incluir un polipéptido, un péptido o una proteína que sea o sea al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una proteína ClfB. En ciertos aspectos, la proteína ClfB tendrá toda o una parte de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18.

En aspectos adicionales más de la divulgación, una composición puede incluir un polipéptido, un péptido o una proteína que sea o sea al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una proteína IsdC. En ciertos aspectos, la proteína IsdC tendrá toda o una parte de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19.

En aspectos adicionales más de la divulgación, una composición puede incluir un polipéptido, un péptido o una proteína que sea o sea al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una proteína SasF. En ciertos aspectos, la proteína SasF tendrá toda o una parte de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

En aspectos adicionales más de la divulgación, una composición puede incluir un polipéptido, un péptido o una proteína que sea o sea al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una proteína SdrC. En ciertos aspectos, la proteína SdrC tendrá toda o una parte de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21.

En aspectos adicionales más de la divulgación, una composición puede incluir un polipéptido, un péptido o una proteína que sea o sea al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una proteína ClfA. En ciertos aspectos, la proteína ClfA tendrá toda o una parte de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22.

En aspectos adicionales más de la divulgación, una composición puede incluir un polipéptido, un péptido o una proteína que sea o sea al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una proteína Eap. En ciertos aspectos, la proteína Eap tendrá toda o una parte de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23.

En aspectos adicionales más de la divulgación, una composición puede incluir un polipéptido, un péptido o una proteína que sea o sea al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una proteína Ebh. En ciertos aspectos, la proteína Ebh tendrá toda o una parte de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24.

En aspectos adicionales más de la divulgación, una composición puede incluir un polipéptido, un péptido o una proteína que sea o sea al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una proteína Emp. En ciertos aspectos, la proteína Emp tendrá toda o una parte de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

En aspectos adicionales más de la divulgación, una composición puede incluir un polipéptido, un péptido o una proteína que sea o sea al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una proteína EsaC. En ciertos aspectos, la proteína EsaC tendrá toda o una parte de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26. La secuencia de los polipéptidos EsaC pueden encontrarse en las bases de datos de proteínas e incluye, pero sin limitación, los números de acceso ZP_02760162 (GI:168727885), NP_645081.1 (GI:21281993) y NP_370813.1 (GI:15923279).

En aspectos adicionales más de la divulgación, una composición puede incluir un polipéptido, un péptido o una proteína que sea o sea al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una proteína Coa. En ciertos aspectos, la proteína Coa tendrá toda o una parte de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27.

En aspectos adicionales más de la divulgación, una composición puede incluir un polipéptido, un péptido o una proteína que sea o sea al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una proteína Hla. En ciertos aspectos, la proteína Hla tendrá toda o una parte de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28.

En aspectos adicionales más de la divulgación, una composición puede incluir un polipéptido, un péptido o una proteína que sea o sea al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una proteína vWa. En ciertos aspectos, la proteína vWa tendrá toda o una parte de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29.

En aspectos adicionales más de la divulgación, una composición puede incluir un polipéptido, un péptido o una proteína que sea o sea al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una proteína vWbp. En ciertos aspectos, la proteína vWbp tendrá toda o una parte de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32.

En ciertos aspectos, un polipéptido o segmento/fragmento puede tener una secuencia que sea al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % o más idéntica a la secuencia de aminoácidos del polipéptido de referencia. El término "similitud" se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia que tiene un determinado porcentaje de aminoácidos que bien son idénticos con el polipéptido de referencia o constituyen sustituciones conservativas con los polipéptidos de referencia.

Los polipéptidos descritos en el presente documento pueden incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más aminoácidos de la variante dentro de al menos, o como máximo 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 300, 400, 500, 550, 1.000 o más aminoácidos contiguos, o cualquier intervalo derivable de los mismos, de SEQ ID NO: 2-30 o SEQ ID NO: 32-34.

Un segmento polipeptídico como el descrito en el presente documento puede incluir 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o más aminoácidos de la variante dentro de al menos, o como máximo 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 300, 400, 500, 550, 1.000 o más aminoácidos contiguos, o cualquier intervalo derivable de los mismos, de SEQ ID NO: 2-30 o SEQ ID NO: 32-34.

Las composiciones pueden formularse en una composición farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones de la invención, la bacteria estafilocócica es una bacteria de *S. aureus*.

En aspectos adicionales, se puede administrar una composición más de una vez a un sujeto, y se puede administrar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o más veces. La administración de las composiciones incluye, pero sin limitación, la vía oral, parenteral, subcutánea, intramuscular, intravenosa o diversas combinaciones de las mismas, incluyendo inhalación o aspiración.

En otros aspectos más de la divulgación, una composición comprende una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido descrito en el presente documento o segmentos/fragmentos del mismo. Por lo general, una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido descrito en el presente documento contiene un promotor heterólogo. En ciertos aspectos, una molécula de ácido nucleico recombinante es un vector, en otros aspectos más, el vector es un plásmido. En ciertos aspectos, el vector es un vector vírico. En ciertas realizaciones, una composición incluye una bacteria no estafilocócica recombinante que contiene o expresa un polipéptido descrito en el presente documento. En determinadas realizaciones, la bacteria no estafilocócica recombinante es *Salmonella* u otra bacteria gram-positiva. Una composición normalmente se administra a mamíferos tales como sujetos humanos, pero se contempla la administración a otros animales que sean capaces de generar una respuesta inmune. En realizaciones adicionales, la bacteria estafilocócica que contiene o expresa el polipéptido es *Staphylococcus aureus*. En realizaciones adicionales, la respuesta inmune es una respuesta inmune protectora.

En aspectos adicionales, una composición comprende una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica todo o parte de una o más proteína Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, SpA, vWbp o vWh, o péptido o variante de la misma. Otros antígenos estafilocócicos adicionales que se pueden usar en combinación con los polipéptidos descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, vitronectina de 52 kDa (documento WO 01/60852), Aaa, Aap, Ant, autolisina glucosaminidasa, autolisina amidasa, Cna, proteína de unión a colágeno (documento US6288214), EFB (FIB), proteína de unión a elastina (EbpS), EPB, FbpA, proteína de unión a fibrinógeno (documento US6008341), proteína de unión a fibronectina (documento US5840846), FnbA, FnbB, GehD (documento US 2002/0169288), HarA, HBP, transportador ABC inmunodominante, IsaA/PisA, receptor de laminina, Lipasa GehD, MAP, transportador de Mg^{2+} , análogo de MHC II (documento US5648240), MRPII, Npasa, proteína activadora del ARN III (RAP), SasA, SasB, SasC, SasD, SasK, SBI, SdrF (documento WO 00/12689), SdrG/Fig (documento WO 00/12689), SdrH (documento WO 00/12689), exotoxinas SEA (documento WO 00/02523), exotoxinas SEB (documento WO 00/02523), transportador ABC de SitC y Ni, proteína de unión a SitC/MntC/saliva (documento US5.801.234), SsaA, SSP-1, SSP-2 y/o proteína de unión a Vitronectina. En determinados aspectos, una bacteria es una bacteria no estafilocócica recombinante, tal como una *Salmonella* u otra bacteria gram-positiva.

Las composiciones de la invención normalmente se administran a sujetos humanos, pero se contempla la administración a otros animales que son capaces de generar una respuesta inmune a una bacteria estafilocócica, en particular, ganado, caballos, cabras, ovejas y otros animales domésticos, es decir, mamíferos.

En ciertas realizaciones, la bacteria estafilocócica es *Staphylococcus aureus*. En realizaciones adicionales, la respuesta inmune es una respuesta inmune protectora. En otros aspectos más, las composiciones de la invención se pueden usar en la prevención, mejora, reducción o tratamiento de la infección de tejidos o glándulas, por ejemplo, glándulas mamarias, en particular, mastitis y otras infecciones. Otros métodos incluyen, pero sin limitación, la reducción de forma profiláctica de la carga bacteriana en un sujeto que no muestra signos de infección, en particular, aquellos sujetos que se sospecha que están o que se encuentran en riesgo de ser colonizados por una bacteria diana, por ejemplo, pacientes que están o estarán en riesgo o serán susceptibles de infección durante una estancia, un tratamiento y/o una recuperación en el hospital.

Cualquier realización tratada con respecto a un aspecto de la invención también se aplica a otros aspectos de la invención. En particular, cualquier realización tratada en el contexto de un polipéptido o péptido o ácido nucleico de la variante de SpA se puede implantar con respecto a otros antígenos, tales como Eap, Ebh, Emp, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp, vWh, vitronectina de 52 kDa (documento WO 01/60852), Aaa, Aap, Ant, autolisina glucosaminidasa, autolisina amidasa, Cna, proteína de unión a colágeno (documento US6288214), EFB (FIB), proteína de unión a elastina (EbpS), EPB, FbpA, proteína de unión a fibrinógeno (documento US6008341), proteína de unión a fibronectina (documento US5840846), FnbA, FnbB, GehD (documento US 2002/0169288), HarA, HBP, transportador ABC inmunodominante, IsaA/PisA, receptor de laminina, Lipasa GehD, MAP, transportador de Mg^{2+} , análogo de MHC II (documento US5648240), MRPII, Npasa, proteína activadora del ARN III (RAP), SasA, SasB, SasC, SasD, SasK, SBI, SdrF (documento WO 00/12689), SdrG/Fig (documento WO 00/12689), SdrH (documento WO 00/12689), exotoxinas SEA (documento WO 00/02523), exotoxinas SEB (documento WO 00/02523), transportador ABC de SitC y Ni, proteína de unión a SitC/MntC/saliva (documento US5.801.234), SsaA, SSP-1, SSP-2 y/o proteína de unión a Vitronectina (o ácido nucleico), y viceversa. También se entiende que se pueden excluir específicamente de la composición reivindicada una o más de Eap, Ebh, Emp, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp, vWh, vitronectina de 52 kDa (documento WO 01/60852), Aaa, Aap, Ant, autolisina glucosaminidasa, autolisina amidasa, Cna, proteína de unión a colágeno (documento US6288214), EFB (FIB), proteína de unión a elastina (EbpS), EPB, FbpA, proteína de unión a fibrinógeno (documento US6008341), proteína de unión a fibronectina (documento US5840846), FnbA, FnbB, GehD (documento US 2002/0169288), HarA, HBP, transportador ABC inmunodominante, IsaA/PisA, receptor de laminina, Lipasa GehD, MAP, transportador de Mg^{2+} , análogo de MHC II (documento US5648240), MRPII, Npasa, proteína activadora del ARN III (RAP), SasA, SasB, SasC, SasD, SasK, SBI, SdrF (documento WO 00/12689), SdrG/Fig (documento WO 00/12689), SdrH (documento WO 00/12689), exotoxinas SEA (documento WO 00/02523), exotoxinas SEB (documento WO 00/02523), transportador ABC de SitC y Ni, proteína de unión a SitC/MntC/saliva (documento US5.801.234), SsaA, SSP-1, SSP-2 y/o proteína de unión a Vitronectina.

Las realizaciones de la invención incluyen composiciones que contienen o no contienen una bacteria. Una composición puede incluir o puede no incluir una bacteria estafilocócica atenuada o viable o intacta. En ciertos aspectos, la composición comprende una bacteria que no es una bacteria estafilocócica o no contiene una bacteria estafilocócica. En ciertas realizaciones, una composición bacteriana comprende una variante de la proteína A estafilocócica aislada o expresada de forma recombinante. La composición puede ser o incluir una bacteria estafilocócica modificada por ingeniería genética de forma recombinante, que haya sido modificada de forma que comprenda modificar específicamente la bacteria con respecto a un factor de virulencia secretado o a una proteína de la superficie celular. Por ejemplo, la bacteria se puede modificar de forma recombinante para expresar más de un factor de virulencia o una proteína de la superficie celular de lo que expresaría si no estuviera modificada.

El término "aislado" puede referirse a un ácido nucleico o a un polipéptido que se encuentra sustancialmente libre de material celular, material bacteriano, material vírico o medio de cultivo (cuando se produce mediante técnicas de

ADN recombinante) de su fuente de origen, o precursores químicos u otros productos químicos (cuando se sintetizan químicamente). Además, un compuesto aislado se refiere a aquel que se puede administrar a un sujeto como un compuesto aislado; en otras palabras, el compuesto no puede considerarse simplemente como "aislado" si está adherido a una columna o embebido en gel de agarosa. Además, un "fragmento de ácido nucleico aislado" o "péptido aislado" es un fragmento de ácido nucleico o proteína que no es de origen natural como fragmento y/o normalmente no se encuentra en estado funcional.

Las fracciones de la invención, tales como polipéptidos, péptidos, antígenos o inmunógenos, se pueden conjugar o enlazar de forma covalente o no covalente con otras fracciones tales como adyuvantes, proteínas, péptidos, soportes, fracciones de fluorescencia o marcadores. El término "conjugado" o "inmunconjugado" se usa ampliamente para definir la asociación operativa de una fracción con otro agente y no pretende referirse exclusivamente a cualquier tipo de asociación operativa, y no se limita en particular a la "conjugación" química. En particular, se contemplan las proteínas de fusión recombinantes. Las composiciones de la invención pueden además comprender un adyuvante o un excipiente farmacéuticamente aceptable. Un adyuvante puede acoplarse de forma covalente o no covalente a un polipéptido o péptido de la invención. En ciertos aspectos, el adyuvante se conjuga químicamente a una proteína, un polipéptido o un péptido.

El término "proporcionar" se usa de acuerdo con su significado habitual para indicar "suministrar o facilitar para su uso". En algunos aspectos de la divulgación, la proteína se proporciona directamente mediante la administración de la proteína, mientras que en otros aspectos, la proteína se proporciona de manera eficaz administrando un ácido nucleico que codifica la proteína. En ciertos aspectos, la divulgación contempla composiciones que comprenden diversas combinaciones de ácido nucleico, antígenos, péptidos y/o epítopos.

El sujeto tendrá (por ejemplo, está diagnosticado con una infección estafilocócica), se sospechará que tenga o estará en riesgo de desarrollar una infección estafilocócica. Las composiciones de la presente invención incluyen composiciones inmunogénicas en las que el/los antígeno/s o el/los epítopo/s está/n contenido/s en una cantidad eficaz para lograr el fin deseado. Más concretamente, una cantidad eficaz significa una cantidad de principios activos necesarios para estimular o generar una respuesta inmune, o proporcionar resistencia a, mejora de o mitigación de una infección. En aspectos más específicos, una cantidad eficaz evita, alivia o mejora los síntomas de una enfermedad o infección, o prolonga la supervivencia del sujeto que se está tratando. La determinación de la cantidad eficaz es competencia de los expertos en la materia, en especial, en vista de la divulgación detallada que se proporciona en el presente documento. Para cualquier preparación usada en los métodos de la invención, se puede estimar inicialmente una cantidad o dosis eficaz a partir de estudios *in vitro*, cultivos celulares y/o ensayos con modelos animales. Por ejemplo, se puede formular una dosis en modelos animales para lograr una respuesta inmune deseada o concentración o título de anticuerpo en circulación. Dicha información se puede usar para determinar de forma más exacta las dosis útiles en seres humanos.

Las realizaciones del apartado de ejemplos se entienden como realizaciones de la invención que son aplicables a todos los aspectos de la invención.

El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para referirse a "y/o", a menos que se indique explícitamente que se refiere solo a alternativas o que las alternativas se excluyan entre sí, aunque la divulgación apoya una definición que se refiere solo a alternativas y a "y/o". También se contempla que cualquier cosa enumerada usando el término "o" se puede excluir específicamente.

A lo largo de la presente solicitud, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la desviación típica del error para el dispositivo o método que se está empleando para determinar el valor.

Siguiendo la ley de patentes de larga data, los términos "un" y "una", cuando se usan junto con la expresión "que comprende/n" en las reivindicaciones o en la memoria descriptiva, denota uno o más, a menos que se indique específicamente.

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Sin embargo, debe entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones específicas de la invención, se dan únicamente a modo ilustrativo, ya que hay diversos cambios y modificaciones dentro del alcance de la invención que serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la presente descripción detallada.

Descripción de las figuras

De modo que la materia en la que se logran las características, ventajas y objetos de la invención mencionados anteriormente, así como otros que se aclararán y que pueden entenderse en detalle, en los dibujos adjuntos, se ilustran descripciones más concretas y ciertas realizaciones de la invención brevemente resumidas anteriormente. Estos dibujos forman parte de la memoria descriptiva. Sin embargo, debe observarse que los dibujos adjuntos ilustran ciertas realizaciones de la invención y, por lo tanto, no deben considerarse como limitantes en su alcance.

FIG. 1A-1B. (FIG. 1A) Estructura primaria del precursor de Proteína A con un péptido señal del motivo YSIRK N-terminal, cinco dominios de unión a inmunoglobulina como repeticiones en tándem designadas como E, D, A, B, C, región X y la señal de clasificación LPXTG. (FIG. 1B) Después de la síntesis del precursor de Proteína A, los estafilococos secretan este producto a través de la vía Sec, y la sortasa A escinde la señal de clasificación LPXTG entre los restos T y G. el ataque nucleófilo del grupo amino dentro del lípido II en el producto intermedio enlazado a tioéster de proteína A de sortasa forma el enlace de amida que se enlaza la Proteína A a la envoltura de la pared celular y permite su visualización en la superficie bacteriana.

FIG. 2. Modelo tridimensional de las interacciones moleculares entre el dominio D de SpA de la proteína A, el dominio Fab de VH3 del receptor de la linfocitos B y el dominio Fc γ de la inmunoglobulina. El modelo se deriva de dos estructuras cristalinas (Graille *et al.*, 2000 y Gouda *et al.*, 1992) que revelaron restos de cadenas laterales implicadas en la formación de enlaces iónicos que permiten estos complejos. Gln-9 y Gln-10 de SpA-D potencian la unión a Fc γ , mientras que Asp-36 y Asp-37 permiten la formación de complejos con Fab de VH3.

FIG. 3. Panel izquierdo – La SDS-PAGE teñida con azul de Coomassie revela la posición migratoria de SpA, SpA-D, SpA-D_{Q9,10K;D36,37A}, IgG humana y sortasa A (SrtA) marcadas con His purificadas, una proteína de control. Panel derecho - SDS-PAGE teñida con azul de Coomassie para revelar la elución de complejos de inmunoglobulina de proteína A eluidos después de la cromatografía de afinidad de IgG humana en columnas de Ni-NTA precargadas con SpA, SpA-D, SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} o SrtA.

FIG. 4. Ensayos ELISA para cuantificar la inmunoglobulina humana (hIgG), fragmentos de IgG F(ab)₂ humanos y fragmentos de Fc humanos de inmunoglobulina (hFc). Se recubrieron las placas con cantidades iguales de SpA marcada con His, SpA-D, SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} o SrtA. Se añadieron hIgG-HRP, F(ab)₂-HRP y hFc-HRP a las placas y se incubaron durante una hora. Se registró la absorbancia a 450 nm y representó gráficamente para determinar la mitad de los títulos máximos.

FIG. 5. Se inyectaron SpA-D purificado, SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} o un control simulado de PBS en el peritoneo de ratones y se analizaron en cuanto a su capacidad para reducir la población de linfocitos B en el bazo de ratones BALB/c experimentales. Los animales se sacrificaron 4 horas después de la inyección, se les extirpó el bazo, se homogenizó el tejido y se tiñó con anticuerpos CD19 dirigidos contra linfocitos B. El número de linfocitos B se cuantificó por clasificación FACS.

FIG. 6. Generación de una vacuna de proteína A no toxigénica. a, producto de la traducción de proteína A (SpA) de *S. aureus* Newman y USA300 LAC con un péptido señal N-terminal (recuadro blanco), cinco dominios de unión a inmunoglobulina (IgBD designados E, D, A, B y C), señal de clasificación de región X y C-terminal variable (recuadro negro). b, secuencia de aminoácidos de las cinco IgBD así como de SpA-D_{KKAA} no toxigénica, con las posiciones de haces α -helicoidales triples (H1, H2 y H3), así como glutamina (Q) 9, 10 y aspartato (D) 36, 37 indicados. c, SDS-PAGE teñida con azul Coomassie de SpA, SpA-D, SpA-D_{KKAA} o SrtA purificada en Sefarosa Ni-NTA en presencia o ausencia de inmunoglobulina humana (hIgG). d, ELISA que examina la asociación de SpA, SpA-D o SpA-D_{KKAA} inmovilizado con IgG humana, así como sus fragmentos Fc o F(ab)₂ y el factor de von Willebrand (vWF). e, se cuantificaron mediante FACS linfocitos B CD19+ en el tejido esplénico de ratones BALB/c que se habían inmunizado de manera simulada o tratado con SpA-D o SpA-D_{KKAA}.

FIG. 7. La vacuna de proteína A no toxigénica previene la formación de abscesos. Histopatología del tejido renal aislado durante la necropsia de ratones BALB/c que habían sido inmunizados de manera simulada (PBS) o vacunados con SpA, SpA-D, así como SpA-D_{KKAA} y expuestos a *S. aureus* Newman. Se tiñeron los tejidos seccionados finos con hematoxilina-eosina. Las flechas blancas identifican infiltrados de leucocitos polimorfonucleares (PMN). Las flechas oscuras identifican las comunidades de abscesos estafilocócicas.

FIG. 8. Los anticuerpos generados por la vacuna de proteína A no toxigénica bloquean la función superantigénica de los linfocitos B de SpA. a, los anticuerpos de conejo generados contra SpA-D_{KKAA} se purificaron en una matriz con antígeno inmovilizado y se analizaron mediante SDS-PAGE teñida con azul Coomassie. Los anticuerpos se escindieron con pepsina y los fragmentos F(ab)₂ se purificaron mediante una segunda serie de cromatografía de afinidad en matriz de SpA-D_{KKAA}. b, los F(ab)₂ específicos de SpA-D_{KKAA} interfieren con la unión de SpA o SpA-D a inmunoglobulina humana (hIgG) o; c, al factor de von Willebrand (vWF).

FIG. 9. La proteína A no toxigénica de longitud completa genera mejores respuestas inmunitarias. a, Se purificó SpA_{KKAA} de longitud completa sobre Sefarosa Ni-NTA y se analizó mediante SDS-PAGE teñida con azul Coomassie. b, los linfocitos B CD19+ en tejido esplénico de ratones BALB/c que se habían inmunizado de forma simulada o tratado con SpA o SpA_{KKAA} se cuantificaron mediante FACS. c, ELISA que examina la asociación de SpA inmovilizada o SpA_{KKAA} con IgG humana, así como sus fragmentos Fc o F(ab)₂ o factor de von Willebrand (vWF). d, títulos de anticuerpos en suero humano o murino contra el toxoide diftérico (CRM197) y SpA_{KKAA} no toxigénico o SpA-D_{KKAA}. Se examinaron voluntarios humanos con antecedentes de inmunización con DTaP e infección por estafilococos (n = 16), así como ratones (n = 20) que se habían infectado con *S. aureus* Newman o USA 300 LAC o inmunizado con SpA_{KKAA} o SpA-D_{KKAA} mediante transferencia puntual cuantitativa.

FIG. 10. La infección estafilocócica no genera inmunidad protectora. Se infectaron ratones BALB/c ($n = 20$) con *S. aureus* Newman o con una exposición simulada (PBS) durante treinta días, y la infección se eliminó con tratamiento con cloranfenicol. Ambas cohortes de animales fueron expuestas a *S. aureus* Newman, y se analizó carga bacteriana (UFC) en tejido homogenizado de riñón después de la necropsia realizada en el día 4.

FIG. 11. Comparación de la formación de abscesos en ratones tratados con PBS, SpA, SpA-D y SpA-D_{KKAA}.

FIG. 12A-12C (A). ELISA que examina la asociación de SpA, SpA-D, SpA-D_{KKAA} o SpA-D_{GGSS} inmovilizadas con IgG humana, así como sus fragmentos Fc o F(ab)₂ e IgM. Se comparó la significación estadística de la unión de SpA-D_{KKAA} y SpA-D_{GGSS} a cada ligando frente a SpA-D; la unión de SpA-D se comparó con SpA ($n = 3$); * significa $p < 0,05$; ** significa $p < 0,01$. (B) ELISA que examina el nivel de anticuerpos de reacción cruzada de muestras de suero hiperinmune recogidas de ratones inmunizados activamente ($n = 5$) con SpA-D, SpA-D_{KKAA} y SpA-D_{GGSS}. (C) Formación de abscesos en ratones tratados con PBS, SpA-D, SpA-D_{KKAA} y SpA-D_{GGSS}.

Descripción detallada

Staphylococcus aureus es un comensal de la piel y de los orificios nasales de los seres humanos, y la causa principal de infecciones en el torrente sanguíneo, en la piel y en tejidos blandos (Klevens *et al.*, 2007). El reciente y drástico aumento de la mortalidad de las enfermedades estafilocócicas se atribuye a la propagación de las cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) que no suelen ser susceptibles a los antibióticos (Kennedy *et al.*, 2008). En un gran estudio retrospectivo, la incidencia de infecciones por MRSA fue del 4,6 % de todas las admisiones hospitalarias en Estados Unidos (Klevens *et al.*, 2007). Los costes del cuidado sanitario anual para 94.300 individuos infectados con una MRSA en Estados Unidos superan los 2,4 miles de millones de dólares (Klevens *et al.*, 2007). La actual MRSA epidémica ha precipitado una crisis en la salud pública que es necesario abordar mediante el desarrollo de una vacuna preventiva (Boucher y Corey, 2008). Hasta la fecha, no se dispone de una vacuna autorizada por la FDA que prevenga las enfermedades por *S. aureus*.

Los inventores describen en el presente documento el uso de la proteína A, una proteína de superficie anclada a la pared celular de los estafilococos, para la generación de variantes que puedan servir como vacunas subunitarias. La patogénesis de las infecciones estafilocócicas se inicia a medida que las bacterias van invadiendo la piel o el torrente sanguíneo a través de un traumatismo, heridas quirúrgicas o dispositivos médicos (Lowy, 1998). Aunque el patógeno invasor puede ser fagocitado y destruido, los estafilococos también pueden escapar de las defensas inmunes naturales y sembrar infecciones en los tejidos de los órganos, lo que induce a respuestas inflamatorias que atraen macrófagos, neutrófilos, y otros fagocitos (Lowy, 1998). La respuesta de invasión de las células inmunes en el sitio de la infección está acompañada por la necrosis por licuefacción, ya que el hospedador busca evitar la propagación estafilocócica y permite la eliminación de los restos de tejido necrótico (Lam *et al.*, 1963). Dichas lesiones se pueden observar mediante microscopía como zonas hipercelulares que contienen tejido necrótico, leucocitos y un nido central de bacterias (Lam *et al.*, 1963). A menos que los abscesos estafilocócicos se drenen quirúrgicamente y se traten con antibióticos, la infección diseminada y la septicemia producen un resultado letal (Sheagren, 1984).

II. ANTÍGENOS ESTAFILOCÓCICOS

A. Proteína A estafilocócica (SpA)

Todas las cepas de *Staphylococcus aureus* expresan el gen estructural para la proteína A (spa) (Jensen, 1958; Said-Salim *et al.*, 2003), un factor de virulencia bien caracterizado cuyo producto proteico de superficie anclado a la pared celular (SpA) abarca cinco dominios de unión a la inmunoglobulina altamente homólogos denominados E, D, A, B y C (Sjodahl, 1977). Estos dominios muestran ~ 80 % de identidad a nivel de los aminoácidos, son de 56 a 61 restos de longitud, y están organizados como repeticiones en tándem (Uhlen *et al.*, 1984). La SpA se sintetiza como una proteína precursora con un péptido señal YSIK/GS N-terminal y una señal de clasificación del motivo LPXTG C-terminal (DeDent *et al.*, 2008; Schneewind *et al.*, 1992). La proteína A anclada a la pared celular se muestra en gran abundancia en la superficie estafilocócica (DeDent *et al.*, 2007; Sjoquist *et al.*, 1972). Cada uno de sus dominios de unión a inmunoglobulina se compone de hélices α anti-paralelas que se unen en un haz de tres hélices y se unen al dominio Fc de la inmunoglobulina G (IgG) (Deisenhofer, 1981; Deisenhofer *et al.*, 1978), la cadena pesada de VH3 (Fab) de la IgM (es decir, el receptor de linfocitos B) (Graille *et al.*, 2000), el factor de von Willebrand en su dominio A1 [vWF A1 es un ligando para plaquetas] (O'Seaghdha *et al.*, 2006) y el receptor I (TNFRI) del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) (Gomez *et al.*, 2006), que se muestra sobre las superficies de los epitelios de las vías respiratorias (Gomez *et al.*, 2004; Gomez *et al.*, 2007).

La SpA impide la fagocitosis de neutrófilos de estafilococos mediante su característica de unirse al componente Fc de la IgG (Jensen, 1958; Uhlen *et al.*, 1984). Además, la SpA es capaz de activar la coagulación intravascular mediante su unión a los dominios A1 del factor de von Willebrand (Hartleib *et al.*, 2000). Las proteínas plasmáticas tales como el fibrinógeno y la fibronectina actúan como puentes entre los estafilococos (C1fA y C1fB) y la integrina de plaquetas GPIIb/IIIa (O'Brien *et al.*, 2002), una actividad que se complementa a través de la asociación de la proteína A con vWF A1, lo que permite a los estafilococos capturar las plaquetas a través del receptor de plaquetas

- GPIb- α (Foster, 2005; O'Seaghdha *et al.*, 2006). La SpA también se une al TNFR1 y esta interacción contribuye a la patogénesis de neumonía estafilocócica (Gomez *et al.*, 2004). La SpA activa la señalización proinflamatoria a través de la activación de TRAF2 mediada por TNFR1, la quinasa p38/c-Jun, proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) y el factor de transcripción Rel NF-KB. La unión a SpA además induce la supresión de TNFR1, una actividad que parece requerir la enzima convertidora del TNF (TACE) (Gomez *et al.*, 2007). Todas las actividades de SpA anteriormente mencionadas están mediadas a través de sus cinco dominios de unión a IgG y pueden modificarse mediante las mismas sustituciones de aminoácidos, inicialmente definidas por su requerimiento para la interacción entre la proteína A y la IgG1 humana (Cedergren *et al.*, 1993).
- SpA también funciona como un superantígeno de los linfocitos B mediante la captura de la región Fab de la IgM portadora de VH3, el receptor de linfocitos B (Gomez *et al.*, 2007; Goodyear *et al.*, 2003; Goodyear y Silverman, 2004; Roben *et al.*, 1995). Tras la exposición por vía intravenosa, las mutaciones de la proteína A estafilocócica (SpA) muestran una reducción en la carga estafilocócica en los tejidos de los órganos y reduce de forma drástica la capacidad de formar abscesos (descrita en el presente documento). Durante la infección por *S. aureus* de tipo silvestre, se forman abscesos en un período de cuarenta y ocho horas, y se pueden detectar mediante microscopía óptica del tejido renal en secciones finas y coloreado con hematoxilina-eosina, inicialmente marcado por un flujo de entrada de leucocitos polimorfonucleares (PMN). El día 5 de la infección, los abscesos aumentan de tamaño y encierran una población central de estafilococos, rodeada por una capa de material amorfo eosinófilo y una gran masa de PMN. La histopatología reveló una necrosis masiva de PMN en la proximidad del nido estafilocócico en el centro de las lesiones de abscesos, además de una capa de fagocitos sanos. Los inventores además observaron un borde de PMN necróticos en la periferia de lesiones de abscesos, bordeando la pseudocápsula eosinófila que separaba el tejido renal sano de la lesión infecciosa. Las variantes estafilocócicas carentes de la proteína A no son capaces de establecer los rasgos histopatológicos de los abscesos, y se eliminan durante la infección.
- En estudios previos, Cedergren *et al.* (1993) diseñaron cinco sustituciones individuales en el subdominio de unión al fragmento Fc del dominio B de SpA, L17D, N28A, I31A y K35A. Estos autores crearon estas proteínas para analizar los datos reunidos de una estructura tridimensional de un complejo entre un dominio de SpA y Fc₁. Cedergren *et al.* determinaron los efectos de estas mutaciones sobre la estabilidad y la unión, pero no completaron el uso de dichas sustituciones para la producción de un antígeno de la vacuna.
- Brown *et al.* (1998) describen estudios diseñados para crear nuevas proteínas basadas en SpA que permitan el uso de condiciones de elución más favorables cuando se usan como ligandos de afinidad. Las mutaciones estudiadas incluyeron mutaciones únicas de Q13A, Q14H, N15A, N15H, F17H, Y18F, L21H, N32H o K39H. Brown *et al.* informan que las sustituciones de Q13A, N15A, N15H y N32H tuvieron poca diferencia con los valores de la constante de disociación, y que la sustitución de Y18F produjo la reducción del doble en la afinidad de unión en comparación con la SpA de tipo silvestre. Brown *et al.* también informan que las sustituciones de L21H y F17H disminuyen la afinidad de unión cinco veces y cien veces respectivamente. Los autores también estudiaron sustituciones análogas en dos dominios en tándem. Por lo tanto, los estudios de Brown *et al.* se dirigieron a generar una SpA con un perfil de elución más favorable, de ahí el uso de las sustituciones de His para proporcionar una alteración sensible al pH en la afinidad de unión. Brown *et al.* no mencionaron el uso de SpA como antígeno vacunal.
- Graille *et al.* (2000) describen una estructura cristalina del dominio D de SpA y el fragmento Fab de un anticuerpo IgM humano. Graille *et al.* definen, mediante el análisis de una estructura cristalina, los restos de aminoácidos del dominio D que interactúan con el fragmento Fab como restos Q26, G29, F30, Q32, S33, D36, D37, Q40, N43, E47 o L51, así como los restos de aminoácido que forman la superficie de contacto entre los subdominios del dominio D. Graille *et al.* definen las interacciones moleculares de estas dos proteínas, pero no mencionan ningún uso de sustituciones en los restos que interactúan para producir un antígeno vacunal.
- O'Seaghdha *et al.* (2006) describe estudios sobre la dilucidación de qué subdominio del dominio D se une a vWF. Los autores generaron mutaciones únicas bien en los subdominios de unión a Fc o a VH3, es decir, los restos de aminoácidos F5A, Q9A, Q10A, F13A, Y14A, L17A, N28A, I31A, K35A, G29A, F30A, S33A, D36A, D37A, Q40A, E47A o Q32A. Los autores descubrieron que vWF se une al mismo subdominio que se une Fc. O'Seaghdha *et al.* definen el subdominio del dominio D responsable de la unión a vWF, pero está silenciado con respecto a cualquier uso de sustituciones en los restos que interactúan en la producción de un antígeno vacunal.
- [0113] Gomez *et al.* (2006) describe la identificación de los restos responsables de la activación del TNFR1 mediante el uso de mutaciones únicas de F5A, F13A, Y14A, L17A, N21A, I31A, Q32A y K35A. Gomez *et al.* no mencionan ningún uso de las sustituciones en los restos de interacción en la producción de un antígeno vacunal.
- Se purificó proteína A recombinante marcada por afinidad, un polipéptido que abarca los cinco dominios de la IgG (EDCAB) (Sjodahl, 1977), pero que carece de la región X C-terminal (Guss *et al.*, 1984), de *E. coli* recombinante y se usó como un antígeno vacunal (Stranger-Jones *et al.*, 2006). Debido a la propiedad de la SpA de unirse a la parte Fc de la IgG, no se puede medir una respuesta inmune humoral específica a la proteína A (Stranger-Jones *et al.*, 2006). Los inventores han superado este obstáculo a través de la generación de SpA-DQ9,10K;D36,37A. Los ratones BALB/c inmunizados con la proteína A recombinante (SpA) mostraron una protección significativa contra la exposición por vía intravenosa con cepas de *S. aureus*: una reducción logarítmica de 2.951 en la carga

estafilocócica en comparación con el tipo silvestre ($p > 0,005$; prueba t de Student) (Stranger-Jones *et al.*, 2006). Los anticuerpos específicos de SpA pueden causar un aclaramiento fagocítico previo a la formación de abscesos de la barrera eosinófila mencionada anteriormente en los abscesos que separan las comunidades estafilocócicas de las células inmunes, ya que estas no se forman durante la infección con las cepas de mutantes de la proteína A. Cada uno de los cinco dominios de SpA (es decir, los dominios formados a partir de haces de tres hélices denominados E, D, A, B y C) ejerce propiedades de unión similares (Jansson *et al.*, 1998). La estructura cristalina y en solución del dominio D se ha solucionado con y sin los ligandos Fc y VH3 (Fab), que se unen a la proteína A de forma no competitiva en sitios distintos (Graille *et al.*, 2000). Las mutaciones en los restos que se sabe están implicados en la unión a IgG (FS, Q9, Q10, S11, F13, Y14, L17, N28, I31 y K35), también se requieren para la unión de vWF A1 y TNFR1 (Cedergren *et al.*, 1993; Gomez *et al.*, 2006; O'Seaghdha *et al.*, 2006), mientras que los restos importantes para la interacción de VH3 (Q26, G29, F30, S33, D36, D37, Q40, N43, E47) parecen no tener impacto sobre las otras actividades de unión (Graille *et al.*, 2000; Jansson *et al.*, 1998). SpA se dirige específicamente a un subconjunto de linfocitos B que expresa IgM relacionada con la familia VH3 en su superficie, es decir, receptores de linfocitos B de tipo VH3 (Roben *et al.*, 1995). Ante la interacción con SpA, estos linfocitos B proliferan y se destinan a la apoptosis, lo que conduce a una eliminación preferencial y prolongada de los linfocitos B de tipo innato (es decir, los linfocitos B de la zona marginal y los linfocitos B2 foliculares) (Goodyear *et al.*, 2003; Goodyear *et al.*, 2004).

Base molecular de la función y presentación en la superficie de la proteína A. La proteína A se sintetiza como precursor en el citoplasma bacteriano y se secreta a través de su péptido señal YSIK en su pared transversal, es decir, el septo de división celular de los estafilococos (FIG. 1) (DeDent *et al.*, 2007; De Dent *et al.*, 2008). Tras la escisión de la señal de clasificación LPXTG C-terminal, la proteína A se ancla a puentes transversales del péptidoglicano bacteriano mediante la sortasa A (Mazmanian *et al.*, 1999; Schneewind *et al.*, 1995; Mazmanian *et al.*, 2000). La proteína A es la proteína de superficie más abundante de los estafilococos; la molécula es expresada por casi todas las cepas de *S. aureus* (Cespedes *et al.*, 2005; Kennedy *et al.*, 2008; Said-Salim *et al.*, 2003). Los estafilococos giran en torno al 15-20 % de su pared celular por ciclo de división (Navarre y Schneewind, 1999). Las hidrolasas murinas escinden las cadenas de glicano y los péptidos de la pared del péptidoglicano, liberando de este modo la proteína A con su tetrapéptido disacárido de la pared celular C-terminal hacia el medio extracelular (Ton-That *et al.*, 1999). Por tanto, mediante su diseño fisiológico, la proteína A tanto se ancla a la pared celular como se muestra sobre la superficie bacteriana, pero también se libera hacia los tejidos circundantes durante la infección del hospedador (Marraffini *et al.*, 2006).

La proteína A captura inmunoglobulinas en la superficie bacteriana y esta actividad bioquímica permite el escape estafilocócico de las respuestas inmunes innatas y adquiridas del hospedador (Jensen, 1958; Goodyear *et al.*, 2004). Lo interesante es que la región X de la proteína A (Guss *et al.*, 1984), un dominio de repetición que une los dominios de unión a IgG a la señal de clasificación LPXTG/anclaje a la pared celular, es quizás la parte más variable del genoma estafilocócico (Said-Salim, 2003; Schneewind *et al.*, 1992). Cada uno de los cinco dominios de unión a la inmunoglobulina de la proteína A (SpA), formados a partir de haces de tres hélices y denominados E, D, A, B y C, ejerce propiedades funcionales y estructurales similares (Sjodahl, 1977; Jansson *et al.*, 1998). La estructura cristalina y en solución del dominio D se ha resuelto con y sin los ligandos Fc y VH3 (Fab), que se unen a la proteína A de una forma no competitiva en distintos sitios (Graille 2000).

En el complejo de estructura cristalina, Fab interactúa con la hélice II y la hélice III del dominio D a través de una superficie compuesta de cuatro cadenas β de la región VH (Graille 2000). El eje principal de la hélice II del dominio D es de aproximadamente 50° con respecto a la orientación de las cadenas, y la parte interhelicoidal del dominio D es la más próxima a la cadena C0. El sitio de interacción en Fab se encuentra apartado de la región constante de la cadena pesada y la cadena ligera de la Ig. La interacción implica los siguientes restos del dominio D: Asp-36 de la hélice II, Asp-37 y Gln-40 en el bucle entre la hélice II y la hélice III y otros restos diversos (Graille, 2000). Ambas superficies de interacción se componen predominantemente de cadenas laterales polares, con tres restos de carga negativa en el dominio D y dos restos de carga positiva en Fab 2A2 enterrado por la interacción, lo que proporciona una atracción electrostática global entre las dos moléculas. De las cinco interacciones polares identificadas entre Fab y el dominio D, tres son entre las cadenas laterales. Se forma un puente de sal entre Arg-H19 y Asp-36, y se realizan dos enlaces de hidrógeno entre Tyr-H59 y Asp-37, y entre Asn-H82a y Ser-33. Debido a la conservación de Asp-36 y Asp-37 en los cinco dominios de unión a IgG de la proteína A, los inventores mutaron estos restos.

Los sitios SpA-D responsables de la unión a Fab se encuentran estructuralmente separados de la superficie del dominio que media en la unión a Fc γ . La interacción de Fc γ con el dominio D implica principalmente a los restos en la hélice I, con una menor implicación de la hélice II (Gouda *et al.*, 1992; Deisenhofer, 1981). A excepción de Gln-32, un contacto de poca importancia en ambos complejos, ninguno de los restos que median en la interacción de Fc γ participa en la unión a Fab. Para examinar la relación espacial entre estos diferentes sitios de unión a Ig, se han superpuesto los dominios de SpA en estos complejos para construir un modelo de un complejo entre Fab, el dominio D de SpA y la molécula Fc γ . En este modelo ternario, Fab y Fc γ forman una estructura de tipo sándwich en torno a las caras opuestas de la hélice II sin evidencia de impedimento estérico de ninguna de las interacciones. Dichos hallazgos ilustran cómo, a pesar de su pequeño tamaño (es decir, 56-61 aa), un dominio de SpA puede mostrar simultáneamente ambas actividades, lo que explica la evidencia experimental de que las interacciones de Fab con un dominio individual son no-competitivas. Los restos para la interacción entre SpA-D y Fc γ son Gln-9 y Gln-10.

Por el contrario, la ocupación de la parte Fc de IgG en el dominio D bloquea su interacción con el vWF A1 y probablemente también el TNFR1 (O'Seaghdha *et al.*, 2006). Las mutaciones en los restos esenciales para la unión a Fc de IgG (F5, Q9, Q10, S11, F13, Y14, L17, N28, I31 y K35) también se requieren para la unión a vWF A1 y a TNFR1 (O'Seaghdha *et al.*, 2006; Cedergren *et al.*, 1993; Gomez *et al.*, 2006), mientras que los restos fundamentales para la interacción con VH3 (Q26, G29, F30, S33, D36, D37, Q40, N43, E47) no tienen impacto alguno en las actividades de unión de Fc, vWF A1 o TNFR1 de la IgG (Jansson *et al.*, 1998; Graille *et al.*, 2000). La actividad de unión a Fab de la inmunoglobulina de la proteína A se dirige a un subconjunto de linfocitos B que expresan IgM relacionada con la familia V_H3 en su superficie, es decir, estas moléculas funcionan como receptores de linfocitos B de tipo VH3 (Roben *et al.*, 1995). Tras la interacción con SpA, estos linfocitos B proliferan rápidamente y, a continuación, se destinan a la apoptosis, lo que conduce a una eliminación preferencial y prolongada de los linfocitos B de tipo innato (es decir, linfocitos B de la zona marginal y linfocitos B2 foliculares) (Goodyear y Silverman, 2004; Goodyear y Silverman, 2003). Más del 40 % de los linfocitos B circulantes son la diana de la interacción de la proteína A, y la familia V_H3 representa la mayor familia de receptores de linfocitos B humanos que confieren respuestas humorales protectoras contra los patógenos (Goodyear y Silverman, 2004; Goodyear y Silverman, 2003). Por lo tanto, la proteína A funciona de forma análoga hacia los superantígenos estafilocócicos (Roben *et al.*, 1995), a pesar de que esta última clase de moléculas, por ejemplo, SEB, TSST-1, TSST-2, forman complejos con el receptor de linfocitos T para estimular inadecuadamente las respuestas inmunes del hospedador, generando, de ese modo, rasgos de enfermedad característicos de las infecciones estafilocócicas (Roben *et al.*, 1995; Tiedemann *et al.*, 1995). Dichos hallazgos en conjunto documentan las contribuciones de la proteína A en cuanto al establecimiento de infecciones estafilocócicas y en la modulación de las respuestas inmunes del hospedador.

En resumen, puede verse que los dominios de la proteína A muestran dos superficies de contacto diferentes para la unión con moléculas hospedadoras, y cualquier desarrollo de vacunas a base de proteína A debe considerar la generación de variantes que no perturben la señalización de la célula hospedadora, la agregación plaquetaria, el secuestro de inmunoglobulinas o la inducción de la proliferación y la apoptosis de linfocitos B. Dichas variantes de la proteína A deberían además ser de utilidad a la hora de analizar las vacunas para determinar la capacidad de generar anticuerpos que bloqueen las actividades de la SpA mencionadas anteriormente y ocupar los cinco dominios de repetición en sus superficies de contacto de unión doble. Dicho objetivo se articula y se aplica en el presente documento por primera vez, y se describen en detalle métodos para la generación de variantes de la proteína A que se puedan usar como una vacuna segura para seres humanos. Para alterar la unión de Fc γ , vWF A1 y TNFR1 a la IgG, se mutaron la glutamina (Q) 9 y la 10 [numeración obtenida a partir del dominio D de SpA como se describe en Uhlen *et al.*, 1984], y se generaron sustituciones de lisina para ambas glutaminas, con la esperanza de que estas suprimieran las propiedades del ligando en la primera superficie de contacto de la unión. Para alterar la unión de VH3 de Fab a la IgM, se mutaron el aspartato (D) 36 y 37, siendo cada uno de ellos necesario para la asociación con el receptor de linfocitos B. Se sustituyeron tanto D36 como D37 con alanina. Las mutaciones Q9,10K y D36,37A se combinan en el presente documento en la molécula recombinante SpA-DQ9,10K;D36,37A y se ensayan para determinar las propiedades de unión de la proteína A. Además, SpA-D y SpA-DQ9,10K;D36,37A se someten a estudios de inmunización en ratones y conejos, y se analizan para determinar [1] la producción de anticuerpos específicos (SpA-D Ab); [2] la capacidad del anticuerpo contra SpA-D de bloquear la asociación entre la proteína A y sus cuatro ligandos diferentes; y, [3] las propiedades del anticuerpo contra SpA-D para generar inmunidad protectora contra infecciones estafilocócicas. (Véase el apartado de ejemplos de más adelante).

B. Coagulasas estafilocócicas

Las coagulasas son enzimas producidas por bacterias *Staphylococcus* que convierten el fibrinógeno en fibrina. Coa y vWh activan la protrombina si proteólisis (Friedrich *et al.*, 2003). El complejo coagulasa-protrombina reconoce el fibrinógeno como un sustrato específico, convirtiéndolo directamente en fibrina. La estructura cristalina del complejo activo reveló la unión de los dominios D1 y D2 a la protrombina y la inserción de su Ile1-Val2 N-terminal en el bolsillo Ile16, lo que induce un sitio activo funcional en el zimógeno a través de un cambio de configuración (Friedrich *et al.*, 2003). El exosito I de la α -trombina, el sitio de reconocimiento del fibrinógeno y el proexosito I de la protrombina son bloqueados por el D2 de Coa (Friedrich *et al.*, 2003). No obstante, la asociación del complejo tetramérico (Coa-protrombina)₂ se une al fibrinógeno en un nuevo sitio con una alta afinidad (Panizzi *et al.*, 2006). Este modelo explica las propiedades coagulantes y la eficaz conversión del fibrinógeno por parte de la coagulasa (Panizzi *et al.*, 2006).

El fibrinógeno es una glicoproteína de gran tamaño ($M_r \sim 340.000$), formada por tres pares de cadenas A α , B β y γ y enlazadas de forma covalente para formar un "dímero de trímeros", en el que A y B designan los fibrinopéptidos liberados por la escisión de la trombina (Panizzi *et al.*, 2006). La molécula alargada se pliega en tres dominios separados, un fragmento E central que contiene los extremos N-terminales de las seis cadenas y dos fragmentos D flanqueantes formados principalmente por los extremos C-terminales de las cadenas B β y γ . Estos dominios globulares están conectados por largas estructuras helicoidales triples. Los complejos de coagulasa-protrombina, que convierten el fibrinógeno humano en la fibrina autopolimerizante, no son la diana de los inhibidores de trombina en circulación (Panizzi *et al.*, 2006). Por lo tanto, las coagulasas estafilocócicas se desvían de la vía fisiológica de coagulación de la sangre.

Todas las cepas de *S. aureus* secretan coagulasa y vWbp (Bjerketorp *et al.*, 2004; Field y Smith, 1945). Aunque, en obras previas, se ha informado de importantes contribuciones de la coagulasa a la patogénesis de las infecciones estafilocócicas (Ekstedt y Yotis, 1960; Smith *et al.*, 1947), investigaciones más recientes con herramientas de genética molecular desafiaron este punto de vista al observar fenotipos sin virulencia con modelos de endocarditis, abscesos cutáneos y mastitis en ratones (Moreillon *et al.*, 1995; Phonimdaeng *et al.*, 1990). La generación de variantes isogénicas de *S. aureus* Newman, un aislado clínico completamente virulento (Duthie *et al.*, 1952), se describe en el presente documento, mostrando los mutantes de coa, de hecho, defectos de virulencia en un modelo de bacteriemia letal y absceso renal en ratones. Según la experiencia de los inventores, *S. aureus* 8325-4 no es completamente virulento, y se presupone que las lesiones mutágenas en esta cepa pueden no ser capaces de revelar defectos de virulencia *in vivo*. Además, los anticuerpos generados contra Coa o vWbp alteran la patogénesis de las infecciones por *S. aureus* Newman hasta el grado de ser un reflejo del impacto de las eliminaciones de los genes. Coa y vWbp contribuyen a la formación de abscesos estafilocócicos y bacteriemia letal, y pueden funcionar como antígenos protectores en vacunas subunitarias.

Estudios bioquímicos documentan el valor biológico de los anticuerpos contra Coa y vWbp. Mediante la unión al antígeno y el bloqueo de su asociación con factores de coagulación, los anticuerpos evitan la formación de complejos Coa-protrombina y vWbp-protrombina. Estudios de transferencia pasiva revelaron la protección de animales experimentales contra la formación de abscesos estafilocócicos y la exposición letal mediante anticuerpos de Coa y vWbp. Por lo tanto, los anticuerpos que neutralizan Coa y vWbp generan protección inmune contra la enfermedad estafilocócica.

Estudios previos revelaron la necesidad de coagulasa para resistir a la fagocitosis en sangre (Smith *et al.*, 1947), y los inventores observaron un fenotipo similar para los mutantes de Δ coa en sangre de ratón tratada con lepirudina (véase el Ejemplo 3 de más adelante). Debido a que el vWbp presenta una mayor afinidad con la protrombina humana que su homólogo en ratones, se sospecha que puede ocurrir lo mismo para las variantes de Δ vWbp en la sangre humana. Además, la expresión de Coa y vWbp en lesiones de abscesos, así como su sorprendente distribución en la pseudocápsula eosinófila que le rodea (las comunidades de abscesos estafilocócicos (SAC) o la pared de fibrina periférica), sugieren que las coagulasas secretadas contribuyen al establecimiento de estas lesiones. Esta hipótesis se ensayó y, de hecho, los mutantes de Δ coa resultaron defectuosos en el establecimiento de abscesos. Un ensayo correspondiente, que bloquea la función de la Coa con anticuerpos específicos, produjo el mismo efecto. Por consiguiente, se propone que la coagulación de la fibrina es un hecho de vital importancia en el establecimiento de abscesos estafilocócicos que puede establecerse como diana para el desarrollo de vacunas protectoras. Debido a su función de solapamiento en la protrombina humana, tanto Coa como vWbp se consideran excelentes candidatos para el desarrollo de vacunas.

C. Otros antígenos estafilocócicos

Las investigaciones a lo largo de diversas décadas pasadas han identificado a las exotoxinas de *S. aureus*, las proteínas de superficie y las moléculas reguladoras como importantes factores de virulencia (Foster, 2005; Mazmanian *et al.*, 2001; Novick, 2003). Se ha logrado un gran avance en cuanto a la regulación de estos genes. Por ejemplo, los estafilococos realizan un censo bacteriano a través de la secreción de péptidos autoinductores que se unen a un receptor afín a una concentración umbral, activando de ese modo reacciones de fosfotransferencia y la activación de la transcripción de muchos de los genes de la exotoxina (Novick, 2003). La patogénesis de las infecciones estafilocócicas se basa en estos factores de virulencia (exotoxinas secretadas, exopolisacáridos y adhesinas de superficie). El desarrollo de vacunas estafilocócicas se ve dificultado por la naturaleza multifacética de los mecanismos de invasión estafilocócica. Está bien establecido que los microorganismos vivos atenuados son vacunas sumamente eficaces; las respuestas inmunes generadas por dichas vacunas suelen ser de mayor magnitud y de mayor duración que las producidas por inmunógenos no replicantes. Una explicación para este hecho puede ser que las cepas vivas atenuadas establecen infecciones limitadas en el hospedador e imitan los estados tempranos de la infección natural. Las realizaciones de la invención se dirigen a composiciones y a métodos que incluyen polipéptidos y péptidos de la variante de SpA, así como otras proteínas, polipéptidos y péptidos extracelulares inmunogénicos (incluyendo tanto péptidos o proteínas secretadas como de la superficie celular) de bacterias gram positivas para su uso en la mitigación o inmunización contra la infección. En realizaciones particulares, la bacteria es una bacteria estafilocócica. Las proteínas, los polipéptidos o los péptidos extracelulares incluyen, pero sin limitación, proteínas secretadas y de la superficie celular de las bacterias diana.

El patógeno humano *S. aureus* secreta EsxA y EsxB, dos proteínas de tipo ESAT-6, a través de la envoltura bacteriana (Burts *et al.*, 2005). Las esxA y esxB estafilocócicas se agrupan con otros seis genes en el orden de transcripción: esxA esaA esaB essB essC esaC esxB. Los acrónimos esa, ess y esx representan accesorios de secreción, sistema de secreción o secreción extracelular de ESAT-6, respectivamente, dependiendo de si las proteínas codificadas desempeña un papel accesorio (esa) o directo (ess) para la secreción, o si se secretan en un el medio extracelular (esx). En el presente documento, se refiere a la agrupación entera de ocho genes como la agrupación Ess. EsxA, esxB, esaA, esaB y esaC son todos necesarios para la síntesis o secreción de EsxA y EsxB. Los mutantes que no producen EsxA, EsxB y EssC presentan defectos en la patogénesis de los abscesos murinos de *S. aureus*, lo que sugiere que este sistema de secreción especializado puede ser una estrategia general de la patogénesis bacteriana humana. Se ha informado de la secreción de sustratos no WXG100 por parte de la vía de

ESX-1 para diversos antígenos incluyendo EspA, EspB, Rv3483c y Rv3615c (Fortune *et al.*, 2005; MacGurn *et al.*, 2005; McLaughlin *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2007). También se ha mostrado que la vía alternativa de ESX-5 secreta tanto proteínas WXG100 como no WXG100 en micobacterias patogénicas (Abdallah *et al.*, 2007; Abdallah *et al.*, 2006).

La vía Ess de *Staphylococcus aureus* puede verse como un módulo de secreción dotado de componentes de transporte especializados (Ess), factores accesorios (Esa) y sustratos de secreción afines (Esx). EssA, EssB y EssC se requieren para la secreción de EsxA y EsxB. Debido a que se prevé que son proteínas transmembrana, se contempla que estas proteínas forman un aparato de secreción. Algunas de las proteínas de esta agrupación de genes ess pueden transportar de forma activa sustratos segregados (actuando como un motor), mientras que otras pueden regular el transporte (regulador). La regulación puede realizarse, pero sin limitación, mediante mecanismos de transcripción o posteriores a la traducción para polipéptidos secretados, la clasificación de sustratos específicos para ubicaciones definidas (por ejemplo, medio extracelular o células hospedadoras) o el seguimiento del tiempo de los eventos de secreción durante la infección. En este momento, no está claro si todas las proteínas Esx secretadas funcionan como toxinas o contribuyen indirectamente a la patogénesis.

Los estafilococos se basan en la adhesión mediada por las proteínas de superficie a las células hospedadoras o la invasión de tejidos como una estrategia para escapar de las defensas inmunes. Además, *S. aureus* utiliza las proteínas de superficie para secuestrar el hierro del hospedador durante la infección. La mayoría de las proteínas de superficie implicadas en la patogénesis estafilocócica portan señales de clasificación C-terminales, es decir, están enlazadas de forma covalente a la envoltura de la pared celular mediante la sortasa. Además, las cepas estafilocócicas que carecen de los genes requeridos para el anclaje de las proteínas de superficie, es decir, sortasa A y B, presentan una espectacular deficiencia de virulencia en diversos modelos diferentes de enfermedad en ratón. Por lo tanto, los antígenos de las proteínas de superficie representan una diana para la vacuna validada, ya que los genes correspondientes son esenciales para el desarrollo de la enfermedad estafilocócica y pueden aprovecharse en diversas realizaciones de la invención. La superfamilia de enzimas sortasa son transpeptidasas gram-positivas responsables del anclaje de los factores de virulencia de las proteínas de superficie a la capa de peptidoglicano de la pared celular. Se han identificado dos isoformas de la sortasa en *Staphylococcus aureus*, SrtA y SrtB. Se ha mostrado que estas enzimas reconocen el motivo LPXTG en el sustrato proteico. La isoforma SrtB parece ser importante en la adquisición del hierro hémico y la homeostasis del hierro, mientras que la isoforma SrtA desempeña un papel de vital importancia en la patogénesis de las bacterias gram-positivas modulando la capacidad de la bacteria para adherirse al tejido del hospedador a través del anclaje covalente de las adhesinas y otras proteínas al peptidoglicano de la pared celular. En determinadas realizaciones, las variantes de SpA descritas en el presente documento se pueden usar en combinación con otras proteínas estafilocócicas tales como las proteínas Coa, Eap, Ebh, Emp, EsaC, EsaB, EsxA, EsxB, Hla, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, IsdC, SasF, vWbp y/o vWh.

Ciertas realizaciones de la invención incluyen composiciones proteicas que incluyen polipéptidos, péptidos o ácidos nucleicos que codifican una o varias variantes de SpA y otros antígenos estafilocócicos tales como otras proteínas transportadas por la vía Ess, o sustratos de sortasa. Estas proteínas se pueden modificar mediante la eliminación, inserción y/o sustitución.

Los polipéptidos Esx incluyen la secuencia de aminoácidos de las proteínas Esx de las bacterias del género *Staphylococcus*. La secuencia Esx puede ser de una determinada especie de estafilococo, tal como de *Staphylococcus aureus*, y puede proceder de una determinada cepa, tal como, por ejemplo, la Newman. En ciertas realizaciones, la secuencia de EsxA es SAV0282 de la cepa Mu50 (que es la misma secuencia de aminoácidos para Newman) y se puede acceder a la misma usando el Número de Acceso del Genbank Q99WU4 (gi|68565539). En otras realizaciones, la secuencia de EsxB es SAV0290 de la cepa Mu50 (que es la misma secuencia de aminoácidos para Newman) y se puede acceder a la misma usando el Número de Acceso del Genbank Q99WT7 (gi|68565532). En realizaciones adicionales, se pueden usar otros polipéptidos transportados por la vía Ess, cuyas secuencias pueden ser identificadas por un experto en la materia usando bases de datos y recursos accesibles por Internet.

Los polipéptidos de sustrato de la sortasa incluyen, pero sin limitación, la secuencia de aminoácidos de las proteínas SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, IsdC o SasF de las bacterias del género *Staphylococcus*. La secuencia del polipéptido de sustrato de la sortasa puede ser de una especie estafilocócica en particular, tal como *Staphylococcus aureus*, y puede proceder de una determinada cepa, tal como, por ejemplo, Newman. En ciertas realizaciones, la secuencia de SdrD procede de la cepa N315 y se puede acceder a la misma usando el Número de Acceso del Genbank NP_373773.1 (gi|15926240). En otras realizaciones, la secuencia de SdrE procede de la cepa N315 y se puede acceder a la misma usando el Número de Acceso del Genbank NP_373774.1 (gi|15926241). En otras realizaciones, la secuencia de IsdA es SAV1130 de la cepa Mu50 (que es la misma secuencia de aminoácidos para Newman) y se puede acceder a la misma usando el Número de Acceso del Genbank NP_371654.1 (gi|15924120). En otras realizaciones, la secuencia de IsdB es SAV1129 de la cepa Mu50 (que es la misma secuencia de aminoácidos para Newman) y se puede acceder a la misma usando el Número de Acceso del Genbank NP_371653.1 (gi|15924119). En realizaciones adicionales, se pueden usar otros polipéptidos transportados por la vía Ess o procesados por la sortasa, cuyas secuencias pueden ser identificadas por un experto en materia usando bases de datos y recursos accesibles por Internet.

Pueden identificarse ejemplos de diversas proteínas que pueden usarse en el contexto de la presente invención mediante el análisis de los registros de bases de datos de genomas bacterianos, incluyendo, pero sin limitación, los números de acceso NC_002951 (GI:57650036 y CP000046 de GenBank), NC_002758 (GI:57634611 y BA000017 de GenBank), NC_002745 (GI:29165615 y BA000018 de GenBank), NC_003923 (GI:21281729 y BA000033 de GenBank), NC_002952 (GI:49482253 y BX571856 de GenBank), NC_002953 (GI:49484912 y BX571857 de GenBank), NC_007793 (GI:87125858 y CP000255 de GenBank), NC_007795 (GI:87201381 y CP000253 de GenBank).

Como se usa en el presente documento, una "proteína" o un "polipéptido" se refiere a una molécula que comprende al menos diez restos de aminoácidos. En algunos aspectos de la divulgación, se emplea una versión de tipo silvestre de una proteína o un polipéptido, sin embargo, en muchas realizaciones de la invención, se emplea una proteína o un polipéptido modificados para generar una respuesta inmune. Los términos descritos anteriormente se pueden usar indistintamente. Una "proteína modificada" o "un polipéptido modificado" o una "variante" se refieren a una proteína o a un polipéptido cuya estructura química, en particular, su secuencia de aminoácidos, se encuentra alterada con respecto a la proteína o el polipéptido de tipo silvestre. En algunas realizaciones, una proteína o un polipéptido modificado/variante tiene al menos una actividad o función modificada (que reconoce que las proteínas o los polipéptidos pueden tener múltiples actividades o funciones). Se contempla específicamente que una proteína o un polipéptido modificado/variante pueden estar alterados con respecto a una actividad o función y seguir conservando una actividad o función de tipo silvestre en otros aspectos, tal como la inmunogenicidad.

En ciertas realizaciones, el tamaño de una proteína o de un polipéptido (de tipo silvestre o modificado) puede comprender, pero sin limitación, , 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775, 800, 825, 850, 875, 900, 925, 950, 975, 1.000, 1.100, 1.200, 1.300, 1.400, 1.500, 1.750, 2.000, 2.250, 2.500 moléculas amino o más, y cualquier intervalo que pueda obtenerse de las mismas, o derivado de una secuencia de aminoácidos correspondiente descrita o a la que se refiere en el presente documento. Se contempla que los polipéptidos se pueden mutar por truncamiento, volviéndolos más cortos que su forma de tipo silvestre correspondiente, pero, además, podrían modificarse fusionando o conjugando una secuencia de proteínas heteróloga con una determinada función (por ejemplo, para la dirección o localización, para el aumento de la inmunogenicidad, con fines de purificación, etc.).

Como se usa en el presente documento, una "molécula amino" se refiere a cualquier aminoácido, derivado de aminoácidos o imitador de aminoácido conocido en la materia. En determinadas realizaciones, los restos de la molécula proteica son secuenciales, sin que ninguna molécula de no amino interrumpa la secuencia de los restos de la molécula amino. En otras realizaciones, la secuencia puede comprender una o más fracciones de moléculas no amino. En determinadas realizaciones, la secuencia de restos de la molécula proteica puede ser interrumpida por una o más fracciones de moléculas no amino.

Por consiguiente, la expresión "composición proteica" engloba secuencias de moléculas amino que comprenden al menos uno de los 20 aminoácidos comunes en las proteínas sintetizadas de forma natural, o al menos un aminoácido modificado o no habitual.

Las composiciones proteicas pueden realizarse mediante cualquier técnica conocida por los expertos en la materia, incluyendo (i) la expresión de proteínas, polipéptidos o péptidos a través de técnicas biológicas moleculares convencionales; (ii) el aislamiento de compuestos proteicos a partir de fuentes naturales; o (iii) la síntesis química de materiales proteicos. Ya se han desvelado previamente las secuencias de nucleótidos, así como de proteínas, polipéptidos y péptidos para diversos genes, y pueden encontrarse en bases de datos informatizadas reconocidas. Una de dichas bases de datos es la base datos Genbank y la GenPept del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (véase en Internet, en ncbi.nlm.nih.gov/). Las regiones de codificación para estos genes se pueden amplificar y/o expresar usando las técnicas desveladas en el presente documento o como será conocido para los expertos habituales en la materia.

Las variantes de la secuencia de aminoácidos de SpA, coagulasas y otros polipéptidos de la divulgación pueden ser variantes sustitutivas, insercionales o de eliminación. Una variación de un polipéptido de la divulgación puede afectar a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 o más aminoácidos contiguos o no contiguos del polipéptido, en comparación con el tipo silvestre. Una variante puede comprender una secuencia de aminoácidos que sea al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 %, incluyendo todos los valores e intervalos que hay entre los mismos, idéntica a cualquier secuencia proporcionada o referenciada en el presente documento, por ejemplo, SEQ ID NO: 2-8 o SEQ ID NO: 11-30. Una variante puede incluir 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o más aminoácidos sustitutos. Se contemplan para su uso en las composiciones y en los métodos descritos en el presente documento un polipéptido procesado o secretado por la vía Ess o por otras proteínas de superficie (véase la Tabla 1) o sustratos de sortasa de cualquier especie y cepa de *staphylococcus*.

- Las variantes de eliminación normalmente carecen de uno o más restos de la proteína nativa o de tipo silvestre. Pueden eliminarse los restos individuales o puede eliminarse una serie de aminoácidos contiguos. Puede introducirse un codón de terminación (mediante sustitución o inserción) en una secuencia de ácido nucleico de codificación para generar una proteína truncada. Los mutantes insercionales normalmente implican la adición de material en un punto no terminal del polipéptido. Esto puede incluir la inserción de uno o más restos. También se pueden generar adiciones terminales, denominadas proteínas de fusión. Estas proteínas de fusión incluyen multímeros o concatámeros de uno o más péptidos o polipéptidos descritos o a los que se refiere en el presente documento.
- Las variantes sustitutivas normalmente contienen el intercambio de un aminoácido por otro en uno o más sitios dentro de la proteína, y pueden diseñarse para modular una o más propiedades del polipéptido, con o sin la pérdida de otras funciones o propiedades. Las sustituciones pueden ser conservativas, es decir, un aminoácido se reemplaza por otro de forma y carga similar. Las sustituciones conservativas son bien conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, los cambios de: alanina por serina; arginina por lisina; asparagina por glutamina o histidina; aspartato por glutamato; cisteína por serina; glutamina por asparagina; glutamato por aspartato; glicina por prolina; histidina por asparagina o glutamina; isoleucina por leucina o valina; leucina por valina o isoleucina; lisina por arginina; metionina por leucina o isoleucina; fenilalanina por tirosina, leucina o metionina; serina por treonina; treonina por serina; triptófano por tirosina; tirosina por triptófano o fenilalanina; y valina por isoleucina o leucina. De manera alternativa, las sustituciones pueden no ser conservativas de manera que se ve afectada una función o actividad del polipéptido. Los cambios no conservativos normalmente implican el reemplazo de un resto con uno que sea químicamente distinto, tal como un aminoácido polar o con carga por un aminoácido no polar o sin carga, y viceversa.

Tabla 2. Ejemplos de proteínas de superficie de cepas de *S. aureus*

n.º SAV	n.º SA	Superficie	MW2	Mu50	N315	Newman	MRSA252*	MSSA476*
SAV0111	SA0107	Spa	492	450	450	520	516	492
SAV2503	SA2291	FnBPA	1015	1038	1038	741	-	1015
SAV2502	SA2290	FnBPB	943	961	961	677	965	957
SAV0811	SA0742	ClfA	946	935	989	933	1029	928
SAV2630	SA2423	ClfB	907	877	877	913	873	905
Np	Np	Cna	1183	-	-	-	1183	1183
SAV0561	SA0519	SdrC	955	953	953	947	906	957
SAV0562	SA0520	SdrD	1347	1385	1385	1315	-	1365
SAV0563	SA0521	SdrE	1141	1141	1141	1166	1137	1141
Np	Np	Pls	-	-	-	-	-	-
SAV2654	SA2447	SasA	2275	2271	2271	2271	1351	2275
SAV2160	SA1964	SasB	686	2481	2481	2481	2222	685
	SA1577	SasC	2186	213	2186	2186	2189	2186
SAV0134	SA0129	SasD	241	241	241	241	221	241
SAV1130	SA0977	SasE/ IsdA	350	350	350	350	354	350
SAV2646	SA2439	SasF	635	635	635	635	627	635
SAV2496		SasG	1371	525	927	-	-	1371
SAV0023	SA0022	SasH	772	-	772	772	786	786
SAV1731	SA1552	SasI	895	891	891	891	534	895
SAV1129	SA0976	SasJ/IsdB	645	645	645	645	652	645
	SA2381	SasK	198	211	211	-	-	197
	Np	SasL	-	232	-	-	-	-
SAV1131	SA0978	IsdC	227	227	227	227	227	227

Las proteínas de la invención pueden ser recombinantes o sintetizarse *in vitro*. Como alternativa, una proteína no recombinante o recombinante se puede aislar de una bacteria. También se contempla la implantación de una bacteria que contiene dicha variante en las composiciones de la invención. Por consiguiente, no es necesario aislar una proteína.

La expresión “codón funcionalmente equivalente” se usa en el presente documento para referirse a codones que codifican el mismo aminoácido, tal como los seis codones para arginina o serina, y también se refiere a codones que codifican aminoácidos biológicamente equivalentes (véase la siguiente Tabla 2).

Tabla 3. Tabla de codones

Aminoácidos			Codones
Alanina	Ala	A	GCA GCC GCG GCU
Cisteína	Cys	C	UGC UGU
Ácido aspártico	Asp	D	GAC GAU
Ácido glutámico	Glu	E	GAA GAG
Fenilalanina	Phe	F	UUC UUU
Glicina	Gly	G	GGA GGC GGG GGU
Histidina	His	H	CAC CAU
Isoleucina	Ile	I	AUA AUC AUU
Lisina	Lys	K	AAA AAG
Leucina	Leu	L	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
Metionina	Met	M	AUG
Asparagina	Asn	N	AAC AAU
Prolina	Pro	P	CCA CCC CCG CCU
Glutamina	Gln	Q	CAA CAG
Arginina	Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
Serina	Ser	S	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
Treonina	Thr	T	ACA ACC ACG ACU
Valina	Val	V	GUA GUC GUG GUU
Triptófano	Trp	W	UGG
Tirosina	Tyr	Y	UAC UAU

Se entenderá que las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos pueden incluir restos adicionales, tales como aminoácidos N- o C-terminales adicionales, o secuencias 5' o 3', respectivamente, y aun así seguir siendo esencialmente como se expone en una de las secuencias desveladas en el presente documento, siempre que la secuencia cumpla con los criterios establecidos anteriormente, incluyendo el mantenimiento de la actividad biológica de la proteína (por ejemplo, la inmunogenicidad) en lo que se refiere a la expresión de proteínas. La adición de secuencias terminales se aplica particularmente a las secuencias de ácidos nucleicos que pueden, por ejemplo, incluir diversas secuencias no codificantes que flanqueen la parte 5' o la 3' de la región de codificación.

A continuación se presente una descripción basada en el cambio de aminoácidos de una proteína para crear una variante de polipéptido o péptido. Por ejemplo, se pueden reemplazar ciertos aminoácidos por otros aminoácidos en una estructura proteica con o sin apreciar pérdida de capacidad de unión interactiva con estructuras tales como, por ejemplo, regiones de unión al antígeno de anticuerpos o sitios de unión en moléculas sustrato. Ya que es la capacidad y naturaleza interactiva de una proteína lo que define esa actividad funcional de la proteína, pueden realizarse ciertas sustituciones de aminoácidos en una secuencia proteica, y en su secuencia de codificación de ADN subyacente, y, no obstante, producir una proteína con una propiedad deseable. Los inventores contemplan, por tanto, que es posible realizar diversos cambios en las secuencias de ADN de los genes.

Se contempla que, en las composiciones de la invención, hay entre 0,001 mg y 10 mg de polipéptido, péptido y/o proteína total por ml. La concentración de la proteína en una composición puede ser de aproximadamente, al menos aproximadamente o como máximo aproximadamente 0,001, 0,010, 0,050, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0 mg/ml o más. De esto, aproximadamente, al menos aproximadamente o como máximo aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 % puede ser una variante de SpA, y se puede usar en combinación con otros péptidos o polipéptidos, tales como otros péptidos bacterianos y/o antígenos.

La presente invención contempla polipéptidos o péptidos de la variante de SpA para su uso en un método de terapia preventiva o método terapéutico contra el desarrollo de una enfermedad o afección asociada con una infección por un patógeno estafilocócico.

En ciertas realizaciones, las combinaciones de antígenos estafilocócicos se usan en la producción de una composición inmunogénica que sea eficaz en el tratamiento o la prevención de infecciones estafilocócicas. Las infecciones estafilocócicas se desarrollan a lo largo de varias etapas diferentes. Por ejemplo, el ciclo de vida estafilocócico implica la colonización de comensales, el inicio de la infección accediendo a tejidos anexos o al torrente sanguíneo, y/o la multiplicación anaeróbica en la sangre. La interacción entre los determinantes de virulencia de *S. aureus* y los mecanismos de defensa del hospedador puede inducir complicaciones tales como endocarditis, formación de abscesos metastásica y síndrome de sepsis. Las diferentes moléculas en la superficie de la bacteria participan en diferentes etapas del ciclo de infección. Las combinaciones de ciertos antígenos pueden generar una respuesta inmune que proteja contra múltiples etapas de la infección estafilocócica. La efectividad de la respuesta inmune puede medirse en ensayos de modelos en animales y/o usando un ensayo opsonofagocítico.

D. Polipéptidos y producción de polipéptidos

La presente invención describe polipéptidos, péptidos y proteínas, y fragmentos inmunogénicos de los mismos, para su uso en diversas realizaciones de la presente invención. Por ejemplo, los polipéptidos específicos se ensayan o se usan para generar una respuesta inmune. Todas o parte de las proteínas de la invención también se pueden sintetizar en solución o en un soporte sólido de acuerdo con técnicas convencionales. Se encuentran disponibles en el mercado diversos sintetizadores automáticos, y se pueden usar de acuerdo con protocolos conocidos. Véase, por ejemplo, Stewart y Young, (1984); Tam *et al.*, (1983); Merrifield, (1986); y Barany y Merrifield (1979).

De manera alternativa, se puede emplear la tecnología de ADN recombinante, en la que una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido de la invención se inserta en un vector de expresión, se transforma o se transfecta en una célula hospedadora apropiada y se cultiva en condiciones adecuadas para la expresión.

Un aspecto de la divulgación incluye el uso de la transferencia de genes a las células, incluyendo microorganismos, para la producción y/o presentación de polipéptidos o péptidos. El gen para el polipéptido o péptido de interés puede transferirse a células hospedadoras apropiadas seguido del cultivo de células en condiciones apropiadas. La generación de vectores de expresión recombinantes, y los elementos incluidos en los mismos, son bien conocidos en la técnica y se describen brevemente en el presente documento. Como alternativa, la proteína que se va a producir puede ser una proteína endógena sintetizada habitualmente por la célula que se aísla o se purifica.

Otro aspecto de la divulgación usa estirpes celulares de linfocitos B autólogos, que se transfectan con un vector vírico que expresa un producto inmunogénico, y más concretamente, una proteína que tiene actividad inmunogénica. Otros ejemplos de estirpes celulares hospedadoras de mamíferos incluyen, pero sin limitación, células Vero y HeLa, otras estirpes celulares B y T, tales como CEM, 721.221, H9, Jurkat, Raji, así como estirpes celulares de ovario de hámster chino, W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN y células MDCK. Además, se puede escoger una cepa de la célula hospedadora que module la expresión de las secuencias insertadas, o que modifique y procese el producto génico de la manera deseada. Dichas modificaciones (por ejemplo, la glicosilación) y el procesamiento (por ejemplo, la escisión) de productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células hospedadoras tienen características y mecanismos específicos para el procesamiento posterior a la traducción y la modificación de proteínas. Se pueden escoger estirpes celulares o sistemas hospedadores apropiados para garantizar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína foránea expresada.

Se puede usar un número de sistemas de selección incluyendo, pero sin limitación, timidina quinasa del HSV, hipoxantineguanina fosforibosiltransferasa y genes de adenina fosforibosiltransferasa, en células tk, hgprt o aprt, respectivamente. Además, se puede usar la resistencia antimetabólica como la base de la selección: para dhfr, que confiere resistencia a la trimetoprima y al metotrexato; gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico; neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G418; e hyg, que confiere resistencia a la higromicina.

Las células animales se pueden propagar *in vitro* de dos maneras: como células no dependientes del anclaje que se cultivan en suspensión a través del volumen del cultivo, o como células dependientes del anclaje que requieren la fijación a un sustrato sólido para su propagación (es decir, un crecimiento celular de tipo monocapa).

Los cultivos no dependientes del anclaje o en suspensión a partir de estirpes celulares continuas establecidas son el medio más ampliamente usado de producción a gran escala de células y productos celulares. Sin embargo, las células cultivadas en suspensión tienen limitaciones tales como el potencial tumorigénico y una producción de proteínas inferior a la de las células adherentes.

En los casos en los que se menciona una proteína en concreto en el presente documento, es preferentemente una referencia a una proteína recombinante o nativa, u opcionalmente, una proteína en la que se ha eliminado cualquier secuencia señal. La proteína se puede aislar directamente de la cepa estafilocócica o producirse mediante técnicas de ADN recombinante. Se pueden incorporar fragmentos inmunogénicos de la proteína a la composición

inmunogénica de la invención. Se trata de fragmentos que comprenden al menos 10 aminoácidos, 20 aminoácidos, 30 aminoácidos, 40 aminoácidos, 50 aminoácidos o 100 aminoácidos, incluyendo todos los valores e intervalos entre los mismos, tomados de forma contigua a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína. Además, dichos fragmentos inmunogénicos son inmunológicamente reactivos con los anticuerpos generados contra las proteínas estafilocócicas o con anticuerpos generados por la infección de un hospedador mamífero con estafilococos. Los fragmentos inmunogénicos también incluyen fragmentos que, cuando se administran a una dosis eficaz, (ya sean solos o como un hapteno enlazado a un vehículo), provocan una respuesta inmune protectora o terapéutica contra una infección estafilocócica, en ciertos aspectos es protectora contra una infección por *S. aureus* y/o *S. epidermidis*. Dicho fragmento inmunogénico puede incluir, por ejemplo, la proteína que carece de una secuencia líder N-terminal y/o un dominio transmembrana y/o un dominio de anclaje C-terminal. En un aspecto preferido, el fragmento inmunogénico de acuerdo con la invención comprende sustancialmente todo el dominio extracelular de una proteína que tiene al menos un 80 % de identidad, al menos un 85 % de identidad, al menos un 90 % de identidad, al menos un 95 % de identidad o al menos un 97-99 % de identidad, incluyendo todos los valores e intervalos entre los mismos, con el segmento de la secuencia seleccionado de un polipéptido descrito.

También se incluyen en las composiciones inmunogénicas de la invención proteínas de fusión compuestas de una o más proteínas estafilocócicas, o fragmentos inmunogénicos de proteínas estafilocócicas. Dichas proteínas de fusión se pueden fabricar de manera recombinante, y pueden comprender una parte de al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 proteínas estafilocócicas o segmentos. Como alternativa, una proteína de fusión puede comprender múltiples partes de al menos 1, 2, 3, 4 o 5 proteínas estafilocócicas. Estas pueden combinar diferentes proteínas estafilocócicas y/o múltiples de la misma proteína o fragmento de proteína, o fragmentos inmunogénicos en la misma proteína (formando un multímero o concatámero). Como alternativa, la divulgación también incluye proteínas de fusión individuales de proteínas estafilocócicas o fragmentos inmunogénicos de las mismas, como una proteína de fusión con secuencias heterólogas tales como un suministrador de epítomos de linfocitos T o marcadores de purificación, por ejemplo: β -galactosidasa, glutatión-S-transferasa, proteínas verdes fluorescentes (GFP), marcadores de epítomos tales como FLAG, marcador myc, poli histidina o proteínas de superficie víricas tales como el hemaglutinina del virus de la gripe, o proteínas bacteriana tales como el toxoide tetánico, toxoide diftérico o CRM197.

II. ÁCIDOS NUCLEICOS

En el presente documento se desvelan polinucleótidos recombinantes que codifican las proteínas, los polipéptidos y los péptidos de la invención. Se incluyen las secuencias de ácido nucleico para SpA, coagulasas y otras proteínas bacterianas, y se pueden usar para preparar péptidos o polipéptidos.

Como se usa en la presente solicitud, el término "polinucleótido" se refiere a una molécula de ácido nucleico que bien es recombinante o que se ha aislado libre de ácido nucleico genómico total. El término "polinucleótido" incluye oligonucleótidos (ácidos nucleicos de 100 restos o menos de longitud), vectores recombinantes, incluyendo, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, fagos, virus y similares. Los polinucleótidos incluyen, en ciertos aspectos, secuencias reguladoras, aisladas sustancialmente de sus genes de origen natural o secuencias de codificación de proteínas. Los polinucleótidos pueden ser monocatenarios (de codificación o antisentido) o bicatenarios, y pueden ser ARN, ADN (genómico, ADNc o sintético), análogos de los mismos, o una combinación de los mismos. Las secuencias de codificación o no codificación pueden, pero no necesitan, estar presentes dentro de un polinucleótido.

En este sentido, el término "gen", "polinucleótido" o "ácido nucleico" se usa para referirse a un ácido nucleico que codifica una proteína, un polipéptido o un péptido (incluyendo cualquier secuencia requerida para una transcripción, una modificación posterior a la traducción o una localización apropiadas). Como los expertos en la materia entenderán, este término engloba secuencias genómicas, casetes de expresión, secuencias de ADNc y segmentos de ácido nucleico modificados por ingeniería genética más pequeños que expresan o se pueden adaptar para expresar, proteínas, polipéptidos, dominios, péptidos, proteínas de fusión y mutantes. Un ácido nucleico que codifica parte o la totalidad de un polipéptido puede contener una secuencia de ácido nucleico contigua de: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 441, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1.000, 1.010, 1.020, 1.030, 1.040, 1.050, 1.060, 1.070, 1.080, 1.090, 1.095, 1.100, 1.500, 2.000, 2.500, 3.000, 3.500, 4.000, 4.500, 5.000, 5.500, 6.000, 6.500, 7.000, 7.500, 8.000, 9.000, 10.000 o más nucleótidos, nucleósidos o pares de bases, incluyendo todos los valores e intervalos entre los mismos, de un polinucleótido que codifica una o más secuencias de aminoácidos descritas. También se contempla que un determinado polipéptido puede ser codificado por ácidos nucleicos que contienen variaciones que tienen secuencias de ácido nucleico ligeramente diferentes pero que, no obstante, codificarse la misma proteína o una sustancialmente similar (véase la Tabla 3 anterior).

En realizaciones particulares, la invención se refiere a segmentos de ácido nucleico aislados y vectores recombinantes que incorporan secuencias de ácido nucleico que codifican la variante de SpA o coagulasas. El término "recombinante" se puede usar en combinación con un polinucleótido o un polipéptido y se refiere, en general, a un polipéptido o polinucleótido producido y/o manipulado *in vitro* o que es un producto de replicación de

dicha molécula.

En otras realizaciones, la invención se refiere a segmentos de ácido nucleico aislados y a vectores recombinantes que llevan incorporados secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos o péptidos de variante de SpA o coagulasa para generar una respuesta inmune en un sujeto. También se desvelan ácidos nucleicos para su uso en vacunas genéticas.

Los segmentos de ácido nucleico usados se pueden combinar con otras secuencias de ácido nucleico tales como promotores, señales de poliadenilación, sitios de enzimas de restricción adicionales, múltiples sitios de clonación, otros segmentos de codificación y similares, de modo que su longitud total puede variar considerablemente. Se contempla, por lo tanto, que se puede emplear un fragmento de ácido nucleico de casi cualquier longitud, estando limitada su longitud total preferentemente por la facilidad de preparación y el uso en el protocolo de ácidos nucleicos recombinantes deseado. En algunos casos, una secuencia de ácido nucleico puede codificar una secuencia polipeptídica con secuencias de codificación heterólogas adicionales, por ejemplo, para permitir la purificación del polipéptido, transporte, secreción, modificación posterior a la traducción, o para beneficios terapéuticos tales como la dirección o la eficacia. Como se ha descrito anteriormente, se puede añadir un marcador u otros polipéptidos heterólogos a la secuencia de codificación del polipéptido modificada, de modo que "heterólogo" se refiere a un polipéptido que no es el mismo que el polipéptido modificado.

En ciertas realizaciones diferentes, la invención se refiere a segmentos de ácido nucleico aislados y a vectores recombinantes que incluyen, dentro de su secuencia, una secuencia de ácido nucleico contigua de SEQ ID NO: 1 (dominio D de SpA) o SEQ ID NO: 3 (SpA) o cualquier otras secuencias de ácido nucleico que codifique coagulasas u otros factores de virulencia secretados y/o proteínas de superficie, incluyendo proteínas transportadas por la vía Ess, procesada por la sortasa, o proteínas.

En el presente documento, se desvelan variantes de polinucleótidos que tienen una identidad sustancial con las secuencias desveladas en el presente documento; comprendiendo estas al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad, o una identidad de secuencia superior, incluyendo todos los valores e intervalos entre los mismos, en comparación con una secuencia polinucleotídica de la presente invención, usando los métodos descritos en la presente documento (por ejemplo, análisis BLAST usando parámetros convencionales).

La divulgación también contempla el uso de polinucleótidos que son complementarios a todos los polinucleótidos descritos anteriormente.

A. Vectores

Los polipéptidos de la invención pueden ser codificados por una molécula de ácido nucleico comprendida en un vector. El término "vector" se usa para referirse a una molécula de ácido nucleico portadora en la que puede insertarse una secuencia de ácido nucleico para su introducción en una célula en la que pueda reproducirse o expresarse. Una secuencia de ácido nucleico puede ser "heteróloga", lo que significa que se encuentra en un contexto foráneo a la célula en la que el vector se está introduciendo o al ácido nucleico al que se incorpora, que incluye una secuencia homóloga a una secuencia de la célula o el ácido nucleico, pero en una posición dentro de la célula hospedadora o el ácido nucleico en el que no se encuentra normalmente. Los vectores incluyen ADN, ARN, plásmidos, cósmidos, virus (bacteriófagos, virus animales y virus vegetales), y cromosomas artificiales (por ejemplo, YAC) Un experto en la materia estaría bien preparado para construir un vector mediante técnicas recombinantes convencionales (por ejemplo, Sambrook *et al.*, 2001; Ausubel *et al.*, 1996). Además de codificar un polipéptido de variante de SpA, el vector puede codificar otras secuencias de polipéptidos tales como uno o más péptidos bacterianos, un marcador o un péptido de aumento de la inmunogenicidad. Entre los vectores de utilidad que codifican dichas proteínas de fusión, se incluyen vectores pIN (Inouye *et al.*, 1985), vectores que codifican un tramo de histidinas y vectores pGEX, para su uso en la generación de proteínas de fusión solubles de glutatión-S-transferasa (GST) para su purificación y posterior separación o escisión.

La expresión "vector de expresión" se refiere a un vector que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos parte de un producto génico capaz de transcribirse. En algunos casos, se traducen las moléculas de ARN en una proteína, un polipéptido o un péptido. Los vectores de expresión pueden contener una variedad de "secuencias de control", lo que se refiere a secuencias de ácido nucleico necesarias para la transcripción y, posiblemente, la traducción de una secuencia de codificación enlazada operativamente en un determinado organismo hospedador. Además de controlar las secuencias que gobiernan la transcripción y la traducción, los vectores y los vectores de expresión pueden contener secuencias de ácido nucleico que también cumplen otras funciones y se describen en el presente documento.

1. Promotores y potenciadores

Un "promotor" es una secuencia de control. El promotor normalmente es una región de una secuencia de ácido nucleico en la que se controlan el inicio y la velocidad de transcripción. Puede contener elementos genéticos en los

que pueden unirse proteínas reguladoras y moléculas tales como la ARN polimerasa y otros factores de transcripción. Las expresiones “posicionado operativamente”, “enlazado operativamente”, “bajo el control”, y “bajo el control de la transcripción” significan que un promotor se encuentra en una ubicación y/u orientación funcional correcta en relación a una secuencia de ácido nucleico para controlar el inicio de la transcripción y la expresión de esa secuencia. Un promotor se puede usar o no en combinación con un “potenciador”, que se refiere a una secuencia reguladora que actúa en *cis* implicada en la activación de la transcripción de una secuencia de ácido nucleico.

Como es natural, puede ser importante emplear un promotor y/o un potenciador que dirija de forma eficaz la expresión del segmento de ADN en el tipo de célula u organismo seleccionado para la expresión. Los expertos en la materia de la Biología molecular conocen, en general, el uso de promotores, potenciadores y combinaciones de tipos de células para la expresión de proteínas (véase Sambrook *et al.*, 2001). Los promotores empleados pueden ser constitutivos, específicos del tejido o inducibles, y, en ciertas realizaciones, pueden dirigir una expresión de alto nivel del segmento de ADN introducido en condiciones específicas, tal como la producción a gran escala de proteínas o péptidos recombinantes.

Se pueden emplear diversos elementos/promotores en el contexto de la presente invención para regular la expresión de un gen. Los ejemplos de dichos elementos inducibles, que son regiones de una secuencia de ácido nucleico que se puede activar en respuesta a un estímulo específico, incluyen, pero sin limitación, la cadena pesada de inmunoglobulina (Banerji *et al.*, 1983; Gilles *et al.*, 1983; Grosschedl *et al.*, 1985; Atchinson *et al.*, 1986, 1987; Imler *et al.*, 1987; Weinberger *et al.*, 1984; Kiledjian *et al.*, 1988; Porton *et al.*, 1990), la cadena ligera de inmunoglobulina (Queen *et al.*, 1983; Picard *et al.*, 1984), el receptor de linfocitos T (Luria *et al.*, 1987; Winoto *et al.*, 1989; Redondo *et al.*, 1990), HLA DQ α y/o DQ β (Sullivan *et al.*, 1987), interferón β (Goodbourn *et al.*, 1986; Fujita *et al.*, 1987; Goodbourn *et al.*, 1988), interleucina-2 (Greene *et al.*, 1989), el receptor de la interleucina-2 (Greene *et al.*, 1989; Lin *et al.*, 1990), MHC de clase II 5 (Koch *et al.*, 1989), HLA-DR α de MHC de clase II (Sherman *et al.*, 1989), β -actina (Kawamoto *et al.*, 1988; Ng *et al.*, 1989), creatina quinasa muscular (MCK) (Jaynes *et al.*, 1988; Horlick *et al.*, 1989; Johnson *et al.*, 1989), Prealbúmina (Transthyretin) (Costa *et al.*, 1988), Elastasa I (Ornitz *et al.*, 1987), metalotioneína (MTII) (Karin *et al.*, 1987; Culotta *et al.*, 1989), Colagenasa (Pinkert *et al.*, 1987; Angel *et al.*, 1987), albúmina (Pinkert *et al.*, 1987; Tronche *et al.*, 1989, 1990), α -fetoproteína (Godbout *et al.*, 1988; Campere *et al.*, 1989), γ -globina (Bodine *et al.*, 1987; Perez-Stable *et al.*, 1990), β -globina (Trudel *et al.*, 1987), c-fos (Cohen *et al.*, 1987), c-Ha-Ras (Triesman, 1986; Deschamps *et al.*, 1985), insulina (Edlund *et al.*, 1985), molécula de adhesión a células neuronales (NCAM) (Hirsh *et al.*, 1990), α 1-antitripaína (Latimer *et al.*, 1990), H2B (TH2B) histona (Hwang *et al.*, 1990), colágeno de ratón y/o de tipo I (Ripe *et al.*, 1989), proteínas reguladas por la glucosa (GRP94 y GRP78) (Chang *et al.*, 1989), hormona de crecimiento de rata (Larsen *et al.*, 1986), amiloide A de suero humano (SAA) (Edbrooke *et al.*, 1989), troponina I (TN I) (Yutzey *et al.*, 1989), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Pech *et al.*, 1989), distrofia muscular de Duchenne (Klamut *et al.*, 1990), SV40 (Banerji *et al.*, 1981; Moreau *et al.*, 1981; Sleight *et al.*, 1985; Firak *et al.*, 1986; Herr *et al.*, 1986; Imbra *et al.*, 1986; Kadesch *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 1986; Ondek *et al.*, 1987; Kuhl *et al.*, 1987; Schaffner *et al.*, 1988), poliovirus (Swartzendruber *et al.*, 1975; Vasseur *et al.*, 1980; Katinka *et al.*, 1980, 1981; Tyndell *et al.*, 1981; Dandolo *et al.*, 1983; de Villiers *et al.*, 1984; Hen *et al.*, 1986; Satake *et al.*, 1988; Campbell *et al.*, 1988), retrovirus (Kriegler *et al.*, 1982, 1983; Levinson *et al.*, 1982; Kriegler *et al.*, 1983, 1984a, b, 1988; Bosze *et al.*, 1986; Miksicek *et al.*, 1986; Celander *et al.*, 1987; Thiesen *et al.*, 1988; Celander *et al.*, 1988; Choi *et al.*, 1988; Reisman *et al.*, 1989), virus del papiloma (Campo *et al.*, 1983; Lusky *et al.*, 1983; Spandinos y Wilkie, 1983; Spalholz *et al.*, 1985; Lusky *et al.*, 1986; Cripe *et al.*, 1987; Gloss *et al.*, 1987; Hirochika *et al.*, 1987; Stephens *et al.*, 1987), virus de la hepatitis B (Bulla *et al.*, 1986; Jameel *et al.*, 1986; Shaul *et al.*, 1987; Spandau *et al.*, 1988; Vannice *et al.*, 1988), virus de la inmunodeficiencia humana (Muesing *et al.*, 1987; Hauber *et al.*, 1988; Jakobovits *et al.*, 1988; Feng *et al.*, 1988; Takebe *et al.*, 1988; Rosen *et al.*, 1988; Berkhout *et al.*, 1989; Laspias *et al.*, 1989; Sharp *et al.*, 1989; Braddock *et al.*, 1989), citomegalovirus (CMV) IE (Weber *et al.*, 1984; Boshart *et al.*, 1985; Foelcking *et al.*, 1986), virus de la leucemia de simio de Gibbon (Holbrook *et al.*, 1987; Quinn *et al.*, 1989).

Los elementos inducibles incluyen, pero sin limitación, MT II – éster de forbol (TFA)/metales pesados (Palmiter *et al.*, 1982; Haslinger *et al.*, 1985; Searle *et al.*, 1985; Stuart *et al.*, 1985; Imagawa *et al.*, 1987; Karin *et al.*, 1987; Angel *et al.*, 1987b; McNeall *et al.*, 1989); MMTV (virus de tumor mamario de ratón) - glucocorticoides (Huang *et al.*, 1981; Lee *et al.*, 1981; Majors *et al.*, 1983; Chandler *et al.*, 1983; Lee *et al.*, 1984; Ponta *et al.*, 1985; Sakai *et al.*, 1988); β -interferón - poli(rI)/poli(rC) (Tavernier *et al.*, 1983); Adenovirus 5 E2 - EIA (Imperiale *et al.*, 1984); colagenasa – éster de forbol (TPA) (Angel *et al.*, 1987a); estromelisin – éster de forbol (TPA) (Angel *et al.*, 1987b); SV40 – éster de forbol (TPA) (Angel *et al.*, 1987b); gen MX murino - interferón, virus de la enfermedad de Newcastle (Hug *et al.*, 1988); gen GRP78 - A23187 (Resendez *et al.*, 1988); α -2-macroglobulina - IL-6 (Kunz *et al.*, 1989); Vimentina - Suero (Rittling *et al.*, 1989); gen H-2kb de MHC de clase I - interferón (Blonar *et al.*, 1989); HSP70 – gran antígeno T de EIA/SV40 (Taylor *et al.*, 1989, 1990a, 1990b); proliferina – éster de forbol/TPA (Mordacq *et al.*, 1989); factor de necrosis tumoral - PMA (Hensel *et al.*, 1989); y gen de la hormona estimulante del tiroide α – hormona tiroidea (Chatterjee *et al.*, 1989).

No se cree que el promotor que se emplea en particular para controlar la expresión del péptido o de la proteína que codifica el polinucleótido de la invención sea de importancia fundamental, siempre que sea capaz de expresar el polinucleótido en una célula diana, preferentemente una célula bacteriana. Cuando se dirige una célula humana, es

preferible situar la región de codificación del polinucleótido adyacente a y bajo el control de un promotor que sea capaz de expresarse en una célula humana. En términos generales, dicho promotor podría incluir un promotor bien bacteriano, humano o vírico.

En aspectos de la divulgación en los que se administra un vector a un sujeto para la expresión de una proteína, se contempla que un promotor que se desea para su uso con el vector es aquel que no se encuentra regulado negativamente por las citocinas, o aquel que es lo suficientemente fuerte como para que, incluso estando regulado negativamente, produzca una cantidad eficaz de una variante de SpA para generar una respuesta inmune. Los ejemplos no limitantes de estos son CMV IE y RSV LTR. Se pueden usar promotores específicos de tejidos, en particular, si la expresión es en células en las que se desea la expresión de un antígeno, tal como células dendríticas o macrófagos. Los promotores de MHC I y MHC II de mamífero son ejemplos de dichos promotores específicos de tejidos.

2. Señales de inicio y sitios internos de unión al ribosoma (IRES)

También se puede requerir una señal de inicio específica para una traducción eficaz de secuencias de codificación. Estas señales incluyen el codón de inicio ATG o secuencias adyacentes. Puede ser necesario proporcionar señales de control de la traducción exógenas, incluyendo el codón de inicio ATG. Un experto habitual en la materia sería capaz de determinar esta circunstancia fácilmente y proporcionar las señales necesarias.

En ciertos aspectos de la divulgación, el uso de elementos de sitios internos de entrada al ribosoma (IRES) se emplea para crear mensajes multigénicos o policistrónicos. Los elementos IRES son capaces de evitar el modelo de exploración ribosómica de la traducción dependiente de la caperuza metilada de 5' y comenzar la traducción en sitios internos (Pelletier y Sonenberg, 1988; Macejak y Sarnow, 1991). Los elementos IRES pueden estar enlazados a marcos de lectura abiertos heterólogos. Pueden transcribirse juntos múltiples marcos de lectura abiertos, cada uno separado por un IRES, creando mensajes policistrónicos. Pueden expresarse múltiples genes de manera eficaz usando un solo promotor/potenciador para transcribir un solo mensaje (véanse las patentes de EE.UU. n.º 5.925.565 y 5.935.819).

3. Marcadores seleccionables y detectables

En ciertos aspectos de la divulgación, las células que contienen una construcción de ácido nucleico de la presente invención se pueden identificar *in vitro* o *in vivo* codificando un marcador seleccionable o detectable en el vector de expresión. Cuando se transcribe y se traduce, un marcador confiere un cambio identificable a la célula, lo que permite una fácil identificación de las células que contienen el vector de expresión. En general, un marcador seleccionable es aquel que confiere una propiedad que permite la selección. Un marcador seleccionable positivo es aquel en el que la presencia del marcador permite su selección, mientras que un marcador seleccionable negativo es aquel en el que su presencia evita su selección. Un ejemplo de un marcador seleccionable positivo es un marcador de resistencia al fármaco.

B. Células hospedadoras

Como se usa en el presente documento, el término "célula", y las expresiones "estirpe celular" y "cultivo celular" pueden usarse indistintamente. Todos estos términos además incluyen su progenie, que es todas y cada una de las generaciones posteriores. Se entiende que toda la progenie puede no ser idéntica debido a mutaciones deliberadas o involuntarias. En el contexto de la expresión de una secuencia de ácido nucleico heteróloga, "célula hospedadora" se refiere a una célula procariota o eucariota, e incluye cualquier organismo transformable que sea capaz de replicar un vector o expresar un gen heterólogo codificado por un vector. Una célula hospedadora puede usarse, y ha sido usada, como receptor para vectores o virus. Una célula hospedadora puede ser "transfectada" o "transformada", lo que se refiere a un proceso mediante el que un ácido nucleico exógeno, tal como una secuencia de codificación de proteínas recombinantes, se transfiere a o se introduce en la célula hospedadora. Una célula transformada incluye la célula primaria en cuestión y a su progenie.

Las células hospedadoras pueden derivarse de células procariotas o eucariotas, incluyendo bacterias, células de levadura, células de insecto y células de mamífero para la replicación del vector o la expresión de parte o la totalidad de la/s secuencia/s de ácido nucleico. Se encuentran disponibles numerosas estirpes y cultivos celulares para su uso como una célula hospedadora, y se pueden obtener a través de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), que es una organización que funciona como un archivo para cultivos vivos y materiales genéticos (www.atcc.org).

C. Sistemas de expresión

Existen numerosos sistemas de expresión que comprenden al menos una parte o la totalidad de las composiciones tratadas anteriormente. Los sistemas basados en procariotas y/o eucariotas pueden emplearse para su uso con la presente invención para producir secuencias de ácido nucleico, o sus polipéptidos, proteínas y péptidos afines. Muchos de dichos sistemas se encuentran ampliamente disponibles en el mercado.

El sistema de células/baculovirus de insecto puede producir un alto nivel de expresión de proteínas de un segmento de ácido nucleico heterólogo, tal como se describe en las patentes de EE.UU. n.º 5.871.986, 4.879.236, y que pueden adquirirse, por ejemplo, con el nombre MAXBAC[®] 2.0 de INVITROGEN[®] y BACPACK[™] BACULOVIRUS EXPRESSION SYSTEM de CLONTECH[®].

Además de los sistemas de expresión desvelados de la invención, otros ejemplos de sistemas de expresión incluyen el sistema de expresión de mamíferos inducible COMPLETE CONTROL[™] de STRATAGENE[®], que implica un receptor inducible por ecdisoma sintético, o su sistema de expresión de pET, un sistema de expresión de *E. coli*. Otro ejemplo de un sistema de expresión inducible se encuentra disponible de INVITROGEN[®], el cual porta el sistema T-REX[™] (expresión regulada por tetraciclina), un sistema de expresión de mamíferos inducible que usa el promotor CMV de longitud completa. INVITROGEN[®] también proporciona un sistema de expresión en levaduras denominado sistema de expresión en *Pichia methanolica*, que está diseñado para una producción de alto nivel de proteínas recombinantes en la levadura metilotrófica *Pichia methanolica*. Un experto en la materia sabría cómo expresar un vector, tal como una construcción de expresión, para producir una secuencia de ácido nucleico o su polipéptido, proteína o péptido afín.

III. POLISACÁRIDOS

Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden comprender además polisacáridos capsulares que incluyen uno o más del polisacárido capsular PIA (también conocido como PNAG) y/o *S. aureus* de tipo V y/o de tipo VIII y/o el polisacárido capsular de *S. epidermidis* de Tipo I y/o Tipo II y/o Tipo III.

A. PIA (PNAG)

En la actualidad, es evidente que las diversas formas de polisacáridos de superficie estafilocócicos identificados como PS/A, PIA y SAA son la misma entidad química - PNAG (Maira-Litran *et al.*, 2004). Por lo tanto, el término PIA o PNAG abarca todos los polisacáridos u oligosacáridos obtenidos de los mismos.

PIA es una adhesina polisacárida intercelular, y se compone de un polímero de glucosamina enlazada en β -(1→6) sustituida con constituyentes N-acetilo y O-succinilo. Este polisacárido está presente tanto en *S. aureus* como en *S. epidermidis*, y se puede aislar de cualquier fuente (Joyce *et al.*, 2003; Maira-Litran *et al.*, 2002). Por ejemplo, el PNAG puede aislarse de la cepa MN8m (WO04/43407) de *S. aureus*. La PIA aislada de *S. epidermidis* es un constituyente integral de la biopelícula. Es responsable de mediar en la adhesión célula-célula y, probablemente, también funciona para proteger la colonia en crecimiento de la respuesta inmune del hospedador. Recientemente, se mostró que el polisacárido conocido previamente como poli-N-succinil- β -(1→6)-glucosamina (PNSG) no tiene la estructura esperada, ya que la identificación de la N-succinilación era incorrecta (Maira-Litran *et al.*, 2002). Por lo tanto, el polisacárido conocido formalmente como PNSG y que se ha encontrado ahora que es PNAG, también está englobado por el término PIA.

PIA (o PNAG) pueden ser de diferentes tamaños que varían de más de 400k Da a entre 75 y 400 kDa a entre 10 y 75 kDa, hasta oligosacáridos compuestos de hasta 30 unidades de repetición (de glucosamina enlazada en β -(1→6) sustituida con constituyentes N-acetilo y O-succinilo). Se puede usar cualquier tamaño del polisacárido u oligosacárido de PIA en una composición inmunogénica de la invención; en un aspecto, el polisacárido es de más de 40 kDa. La determinación del tamaño se puede realizar mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, mediante microfluidización, irradiación ultrasónica o mediante escisión química (documentos WO 03/53462, EP497524, EP497525). En ciertos aspectos, PIA (PNAG) es al menos o como máximo de 40-400 kDa, 40-300 kDa, 50-350 kDa, 60-300 kDa, 50-250 kDa y 60-200 kDa.

PIA (PNAG) puede tener un diferente grado de acetilación debido a la sustitución con acetato en los grupos amino. PIA producido *in vitro* está casi totalmente sustituido en los grupos amino (95-100 %). Como alternativa, se puede usar un PIA (PNAG) desacetilado con menos del 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 % de acetilación. Se prefiere el uso de un PIA (PNAG) desacetilado, ya que los epítomos no acetilados de PNAG son eficaces en la mediación de la destrucción opsónica de bacterias Gram-positivas, preferentemente *S. aureus* y/o *S. epidermidis*. En ciertos aspectos, PIA (PNAG) tiene un tamaño de entre 40 kDa y 300 kDa y está desacetilado de manera que un 60 %, 50 %, 40 %, 30 % o 20 % de los grupos amino están acetilados.

El término PNAG (dPNAG) desacetilado se refiere a un polisacárido u oligosacárido PNAG en el que menos de un 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 % o 10 % de los grupos amino están acetilados. En ciertos aspectos, PNAG se desacetila para formar dPNAG tratando químicamente el polisacárido nativo. Por ejemplo, el PNAG nativo se trata con una solución básica de forma que el pH se eleva por encima de 10. Por ejemplo, el PNAG se trata con NaOH, KOH o NH₄OH 0,1-5 M, 0,2-4 M, 0,3-3 M, 0,5-2 M, 0,75-1,5 M o 1 M. El tratamiento es durante al menos 10 a 30 minutos, o 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 o 20 horas a una temperatura de 20-100, 25-80, 30-60 o 30-50 o 35-45 °C. Se puede preparar dPNAG como se describe en el documento WO 04/43405.

El/los polisacárido/s pueden conjugarse o no conjugarse a una proteína vehículo.

B. Polisacáridos del tipo 5 y tipo 8 de *S. aureus*

La mayoría de las cepas de *S. aureus* que causan infección pueden contener polisacáridos de tipo 5 o de tipo 8. Aproximadamente un 60 % de las cepas humanas son de tipo 8 y aproximadamente un 30 % son de tipo 5. Las estructuras de los antígenos del polisacárido capsular de tipo 5 y tipo 8 se describen en Moreau *et al.*, (1990) y en Fournier *et al.*, (1984). Ambos tienen FucNAcp en su unidad de repetición, así como ManNAcA que se puede usar para introducir un grupo sulfhidrilo. Las estructuras son:

Tipo 5

→4)-β-D-ManNAcA(3OAc)-(1→4)-α-L-FucNAc(1→3)-β-D-FucNAc-(1→

Tipo 8

→3)-β-D-ManNAcA(4OAc)-(1→3)-α-L-FucNAc(1→3)-β-D-FucNAc-(1→

Recientemente (Jones, 2005), la espectroscopia de RMN revisó las estructuras a:

Tipo 5

→4)-β-D-ManNAcA-(1→4)-α-L-FucNAc(3OAc)-(1→3)-β-D-FucNAc-(1→

Tipo 8

→3)-β-D-ManNAcA(4OAc)-(1→3)-α-L-FucNAc(1→3)-α-D-FucNAc(1→

Los polisacáridos se pueden extraer de la cepa adecuada de *S. aureus* usando un método bien conocido por los expertos en la materia; véase la patente de EE.UU. n.º 6.294.177. Por ejemplo, ATCC 12902 es una cepa de *S. aureus* de Tipo 5 y ATCC 12605 es una cepa de *S. aureus* de Tipo 8.

Los polisacáridos son de tamaño nativo o pueden dimensionarse, como alternativa, por ejemplo, mediante microfluidización, irradiación ultrasónica o mediante tratamiento químico. La invención además incluye oligosacáridos derivados de los polisacáridos de tipo 5 y 8 de *S. aureus*. Los polisacáridos de tipo 5 y 8 incluidos en la composición inmunogénica de la invención, se conjugan preferentemente con una proteína vehículo tal como se describe más adelante o, como alternativa, no se conjugan. Las composiciones inmunogénicas de la invención contienen, como alternativa, un polisacárido bien de tipo 5 o de tipo 8.

C. Antígeno 336 de *S. aureus*

En el presente documento, se desvelan composiciones inmunogénicas que comprenden el antígeno 336 de *S. aureus* descrito en la patente de EE.UU. n.º 6.294.177. El antígeno 336 comprende una hexosamina enlazada en β, no contiene ningún grupo O-acetilo y se une específicamente a los anticuerpos de *S. aureus* de tipo 336 depositados como ATCC 55804. En un aspecto de la divulgación, el antígeno 336 es un polisacárido que es del tamaño nativo o que se puede dimensionar de manera alternativa, por ejemplo, mediante microfluidización, radiación ultrasónica o mediante tratamiento químico. También se desvelan oligosacáridos obtenidos del antígeno 336. El antígeno 336 puede estar no conjugado o conjugado a una proteína vehículo.

D. Polisacáridos de tipo I, II y III de *S. epidermidis*

Entre los problemas asociados con el uso de los polisacáridos en la vacunación se encuentra el hecho de que los polisacáridos en sí son poco inmunogénicos. Se prefiere que los polisacáridos utilizados en la invención se enlacen a una proteína vehículo que proporcione la ayuda de un linfocito T testigo para mejorar la inmunogenicidad. Los ejemplos de dichos vehículos que pueden conjugarse a inmunógenos polisacáridos incluyen los toxoides de la Difteria y el Tétanos (DT, DT CRM197 y TT, respectivamente), hemocianina de lapa californiana (KLH), y el derivado proteico purificado (PPD) de la tuberculina, exoproteína A de *Pseudomonas aeruginosa* (rEPA), proteína D de *Haemophilus influenzae*, pneumolisina o fragmentos de cualquiera de las anteriores. Los fragmentos adecuados para su uso incluyen fragmentos que engloban epítopos T auxiliares. En particular, el fragmento de la proteína D de *H. influenza* contendrá preferentemente el tercio del extremo N de la proteína. La proteína D es una proteína de unión a IgD de *Haemophilus influenzae* (documento EP 0 594 610 B1) y es un posible inmunógeno. Además, las proteínas estafilocócicas se pueden usar como proteína vehículo en los conjugados de polisacáridos de la invención.

Una proteína vehículo que sería particularmente ventajosa para su uso en el contexto de vacunas estafilocócicas es el toxoide alfa estafilocócico. La forma nativa puede conjugarse a un polisacárido, ya que el proceso de conjugación reduce la toxicidad. Preferentemente, las toxinas alfa detoxificadas genéticamente tales como las variantes His35Leu o His35Arg se usan como vehículos ya que la toxicidad residual es inferior. Como alternativa, la toxina alfa se detoxifica químicamente mediante el tratamiento con un reactivo de entrecruzamiento, formaldehído o glutaraldehído. Una toxina alfa detoxificada genéticamente es detoxificada químicamente de forma opcional, preferentemente mediante el tratamiento con un reactivo de entrecruzamiento, formaldehído o glutaraldehído para reducir adicionalmente la toxicidad.

Los polisacáridos pueden enlazarse a la/s proteína/s vehículo/s mediante cualquier método conocido (por ejemplo, los métodos descritos en las patentes de EE.UU. n.º 4.372.945, 4.474.757 y 4.356.170). Preferentemente, se lleva a cabo la química de conjugación con CDAP (véase el documento WO95/08348). En CDAP, el reactivo de cianilación tetrafluoroborato de 1-ciano-dimetilaminopiridinio (CDAP) se usa preferentemente para la síntesis de conjugados de polisacárido-proteína. La reacción de cianilación puede realizarse según condiciones relativamente suaves, que eviten la hidrólisis de los polisacáridos sensibles a la alcalinidad. Esta síntesis permite un acoplamiento directo con una proteína vehículo.

La conjugación implica preferentemente producir un enlace directo entre la proteína vehículo y el polisacárido. Opcionalmente, se puede introducir un espaciador (tal como dihidruro adípico (ADH)) entre la proteína vehículo y el polisacárido.

IV. RESPUESTA INMUNE Y ENSAYOS

Como se ha tratado anteriormente, la invención se refiere a composiciones para su uso en la generación o inducción de una respuesta inmune en un sujeto contra una variante de SpA o péptido coagulasa. En una realización, la respuesta inmune puede proteger contra o tratar a un sujeto que tiene, o se sospeche que tiene, o está en riesgo de desarrollar una infección o enfermedad relacionada con la misma, en particular, las relacionadas con los estafilococos. Un uso de las composiciones inmunogénicas de la invención es prevenir las infecciones nosocomiales mediante la inoculación a un sujeto antes de someterse a una operación en un hospital o en otro entorno con un elevado riesgo de infección.

A. Inmunoensayos

En el presente documento, se desvelan ensayos serológicos para evaluar si y hasta qué punto una respuesta inmune es inducida o generada por las composiciones de la invención. Existen muchos tipos de inmunoensayos que se pueden implantar. Los inmunoensayos incluyen, pero sin limitación, los descritos en la patente de EE.UU. n.º 4.367.110 (ensayo de tipo sándwich de doble anticuerpo monoclonal) y en la patente de EE.UU. n.º 4.452.901 (ensayo de transferencia Western). Otros ensayos incluyen la inmunoprecipitación de ligandos marcados e inmunocitoquímica, tanto *in vitro* como *in vivo*.

En general, los inmunoensayos son ensayos de unión. Ciertos inmunoensayos preferidos son los diversos tipos de ensayos de inmunoadsorción enzimática (ELISA) y radioinmunoensayos (RIA) conocidos en la técnica. La detección inmunohistoquímica usando secciones de tejidos es también particularmente útil. En un ejemplo, se inmovilizan anticuerpos o antígenos en una superficie seleccionada, tal como un pocillo de una placa de microtitulación de poliestireno, varilla graduada o soporte de columna. A continuación, se añade a los pocillos una composición de ensayo que se sospecha que contiene al antígeno o anticuerpo deseado, tal como una muestra clínica. Tras la unión y el lavado para eliminar complejos inmunes enlazados de manera no específica, se puede detectar el antígeno o el anticuerpo. En general, la detección se realiza mediante la adición de otro anticuerpo, específico del antígeno o anticuerpo deseado, que está enlazado a un marcador detectable. Este tipo de ELISA se conoce como "ELISA de tipo sándwich". La detección también puede realizarse mediante la adición de un segundo anticuerpo específico para el antígeno deseado, seguida de la adición de un tercer anticuerpo que tiene afinidad de unión para el segundo anticuerpo, estando el tercer anticuerpo unido a un marcador detectable.

Los ensayos ELISA de competición también son posibles implantaciones en las que las muestras de ensayo compiten para unirse con cantidades conocidas de antígenos o anticuerpos marcados. La cantidad de especies reactivas en la muestra desconocida se determina mezclando la muestra con las especies marcadas conocidas antes o durante la incubación con pocillos recubiertos. La presencia de especies reactivas en la muestra actúa para reducir la cantidad de especies marcadas disponibles para unirse al pocillo y, por tanto, reduce la señal final. Independientemente del formato empleado, los ELISA tienen determinadas características en común, tales como recubrimiento, incubación o unión, lavado para eliminar las especies enlazadas de forma no específica, y detección de los complejos inmunes enlazados.

Los antígenos o anticuerpos también se pueden enlazar a un soporte sólido tal como en forma de placa, perlas, varilla graduada, membrana o matriz en columna, y la muestra que se va a analizar se aplica al antígeno o anticuerpo inmovilizado. Al recubrir una placa bien con un antígeno o con un anticuerpo, en general, se incubarán los pocillos de la placa con una solución del antígeno o del anticuerpo, bien durante la noche o durante un período de tiempo especificado. A continuación, se lavarán los pocillos de la placa para eliminar el material adsorbido de forma incompleta. Cualquier superficie disponible que quede de los pocillos se "recubre" después con una proteína no específica que es antigénicamente neutral con respecto al antisuero del ensayo. Estas incluyen albúmina de suero bovino (BSA), caseína y soluciones de leche en polvo. El recubrimiento permite el bloqueo de sitios de adsorción no específicos en la superficie de inmovilización y, por tanto, reduce el fondo causado por la unión inespecífica del antisuero sobre la superficie.

B. Diagnóstico de la infección bacteriana

Además del uso de proteínas, polipéptidos y/o péptidos, así como anticuerpos que unen a estos polipéptidos, proteínas y/o péptidos, para tratar o prevenir la infección como se ha descrito anteriormente, la presente divulgación contempla el uso de estos polipéptidos, proteínas, péptidos y/o anticuerpos en una variedad de formas, incluyendo la detección de la presencia de estafilococos para diagnosticar una infección, ya sea en un paciente o en un equipo médico que también pueda infectarse. Un método preferido de detección de la presencia de infecciones implica las etapas de obtener una muestra sospechosa de estar infectada por una o más especies o cepas de bacterias estafilocócicas tales como una muestra tomada de un individuo, por ejemplo, de sangre, saliva, tejidos, hueso, músculo, cartílago o piel. Tras el aislamiento de la muestra, se pueden llevar a cabo ensayos de diagnóstico que utilizan los polipéptidos, las proteínas, los péptidos y/o los anticuerpos de la presente invención para detectar la presencia de estafilococos, y dichas técnicas de ensayo para determinar dicha presencia en una muestra son bien conocidas por los expertos en la materia, e incluyen métodos tales como radioinmunoensayo, análisis de transferencia Western y ensayos de ELISA. En general, se contempla un método de diagnóstico de una infección, en el que se ha añadido a una muestra sospechosa de estar infectada con estafilococos el polipéptido, la proteína, el péptido, el anticuerpo o el anticuerpo monoclonal de acuerdo con la presente invención, y los estafilococos están indicados por la unión del anticuerpo a los polipéptidos, las proteínas y/o los péptidos, o polipéptidos, proteínas y/o péptidos que se unen a los anticuerpos en la muestra.

Por consiguiente, los anticuerpos se pueden usar para la prevención de la infección por bacterias estafilocócicas (es decir, inmunización pasiva), para el tratamiento de una infección en curso o para su uso como herramientas de investigación. El término "anticuerpos", como se usa en el presente documento, incluye anticuerpos monoclonales, policlonales, quiméricos, monocatenarios, biespecíficos, simiescos y humanizados o primatizados, así como fragmentos Fab, tales como los fragmentos que mantienen la especificidad de unión de los anticuerpos, incluyendo los productos de una biblioteca de expresión de inmunoglobulina Fab. Por consiguiente, la divulgación contempla el uso de cadenas simples tales como las cadenas pesadas y ligeras variables de los anticuerpos. La generación de cualquiera de estos tipos de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos es muy conocida por los expertos en la materia. Se pueden encontrar ejemplos específicos de la generación de un anticuerpo hacia una proteína bacteriana en la publicación de patente de EE.UU. n.º 20030153022.

Cualquiera de los polipéptidos, proteínas, péptidos y/o anticuerpos descritos anteriormente se pueden marcar directamente con un marcador detectable para la identificación y cuantificación de bacterias estafilocócicas. Los marcadores para su uso en inmunoensayos son conocidos, en general, por los expertos en la materia, e incluyen enzimas, radioisótopos y sustancias fluorescentes, luminiscentes y cromogénicas, incluyendo particular tales como oro coloidal o perlas de látex. Los inmunoensayos adecuados incluyen ensayos de inmunoadsorción enzimática ligados a una enzima (ELISA).

C. Inmunidad protectora

En algunas realizaciones de la invención, las composiciones proteínicas confieren inmunidad protectora a un sujeto. La inmunidad protectora se refiere a la capacidad de un cuerpo para desarrollar una respuesta inmune específica que protege al sujeto de desarrollar una enfermedad o afección en particular que implique al agente contra el que hay una respuesta inmune. Una cantidad inmunogénicamente eficaz es capaz de conferir inmunidad protectora al sujeto.

Como se usa en el presente documento, en la memoria descriptiva y en el siguiente apartado de reivindicaciones, el término polipéptido o péptido se refiere a un tramo de aminoácidos enlazado covalentemente entre los enlaces peptídicos. Diferentes polipéptidos tienen diferentes funcionalidades de acuerdo con la presente invención. Aunque de acuerdo con un aspecto, un polipéptido se deriva de un inmunógeno diseñado para inducir una respuesta inmune activa en un receptor, según otro aspecto de la invención, un polipéptido se deriva de un anticuerpo que resulta después de la obtención de una respuesta inmune activa en, por ejemplo, un animal, y que puede servir para inducir una respuesta inmune pasiva en el receptor. En ambos casos, sin embargo, el polipéptido está codificado por un polinucleótido de acuerdo con cualquier posible uso de codones.

Como se usa en el presente documento, la expresión "respuesta inmune" o su equivalente "respuesta inmunológica" se refiere al desarrollo de una respuesta humoral (mediada por anticuerpos), celular (mediada por linfocitos T específicos del antígeno o sus productos de secreción) o respuesta tanto humoral como celular dirigida contra una proteína, un péptido, un hidrato de carbono o un polipéptido de la invención en un paciente receptor. Dicha respuesta puede ser una respuesta activa inducida por la administración de inmunógeno o una respuesta pasiva inducida por la administración de anticuerpo, material que contiene anticuerpo o linfocitos T cebadas. Se genera una respuesta inmune celular mediante la presentación de epítopos polipeptídicos en asociación con moléculas MHC de Clase I o Clase II, para activar linfocitos T auxiliares CD4 (+) específicos del antígeno y/o linfocitos T citotóxicos CD8 (+). La respuesta también puede implicar la activación de monocitos, macrófagos, linfocitos NK, basófilos, células dendríticas, astrocitos, células de microglia, eosinófilos u otros componentes de la inmunidad innata. Como se usa en el presente documento, "inmunidad activa" se refiere a cualquier inmunidad conferida a un sujeto mediante la administración de un antígeno.

Como se usa en el presente documento, "inmunidad pasiva" se refiere a cualquier inmunidad conferida a un sujeto sin administración de un antígeno al sujeto. La "inmunidad pasiva", por lo tanto, incluye, pero sin limitación, la administración de efectores inmunes activados que incluyen mediadores celulares o mediadores de proteínas (por ejemplo, anticuerpos monoclonales y/o policlonales) de una respuesta inmune. Se puede usar una composición de anticuerpo monoclonal o policlonal en la inmunización pasiva para la prevención o el tratamiento de la infección por organismos portadores del antígeno reconocido por el anticuerpo. Una composición de anticuerpo puede incluir anticuerpos que se unen a una variedad de antígenos que, a su vez, pueden estar asociados con diversos organismos. El componente de anticuerpo puede ser un antisero policlonal. En ciertos aspectos, el/los anticuerpo/s se purifican por afinidad a partir de un animal o un segundo sujeto que se ha expuesto a uno o varios antígenos. Como alternativa, se puede usar una mezcla de anticuerpos, que es una mezcla de anticuerpos monoclonales y/o policlonales contra antígenos presentes en los mismos microbios u organismos relacionados, o diferentes, tales como bacterias gram-positivas, bacterias gram-negativas, incluyendo, pero sin limitación, la bacteria *Staphylococcus*.

Se puede conferir inmunidad pasiva a un paciente o sujeto administrando al paciente inmunoglobulinas (Ig) y/u otros factores inmunes obtenidos de un donante u otra fuente que no sea el paciente que tenga una inmunorreactividad conocida. En otros aspectos, una composición antigénica de la presente invención se puede administrar a un sujeto que luego actúa como fuente o donante de globulina, producida en respuesta a la exposición a la composición antigénica ("globulina hiperinmune"), que contiene anticuerpos dirigidos contra *Staphylococcus* u otro organismo. Un sujeto así tratado donaría plasma a partir del que se obtendría la globulina hiperinmune, mediante la metodología de fraccionamiento de plasma convencional, y se administraría a otro sujeto para conferir resistencia contra o para tratar la infección por estafilococo. Las globulinas hiperinmunitarias de acuerdo con la invención son particularmente útiles para individuos inmunodeprimidos, para individuos sometidos a procedimientos invasivos o en los que el tiempo no permite al individuo producir sus propios anticuerpos en respuesta a la vacunación. Véanse las patentes de EE.UU. n.º 6.936.258, 6.770.278, 6.756.361, 5.548.066, 5.512.282, 4.338.298 y 4.748.018, para los métodos ilustrativos y las composiciones relacionadas con la inmunidad pasiva.

Para los fines de la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, el término "epítipo" y la expresión "determinante antigénico" se usan indistintamente para referirse a un sitio en un antígeno al que las linfocitos B y/o T responden o reconocen. Los epítipos de linfocitos B pueden formarse tanto a partir de aminoácidos contiguos como aminoácidos no contiguos yuxtapuestos mediante el plegamiento terciario de una proteína. Los epítipos formados a partir de aminoácidos contiguos normalmente se retienen al exponerlos a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítipos formados por plegamiento terciario normalmente se pierden en el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítipo normalmente incluye al menos 3, y más habitualmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una configuración espacial única. Los métodos de determinación de la configuración espacial de los epítipos incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, "Epitope Mapping Protocols" (1996). Los anticuerpos que reconocen el mismo epítipo se pueden identificar en un inmunoensayo simple que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana. Los linfocitos T reconocen epítipos continuos de aproximadamente nueve aminoácidos para las células CD8 o de aproximadamente 13-15 aminoácidos para las células CD4. Los linfocitos T que reconocen el epítipo pueden identificarse mediante ensayos *in vitro* que miden la proliferación dependiente de antígenos, según se determina mediante la incorporación de ³H-timidina H linfocitos T cebados en respuesta a un epítipo (Burke *et al.*, 1994), mediante la destrucción dependiente del antígeno (ensayo de linfocitos T citotóxicos, Tigges *et al.*, 1996) o por secreción de citocinas.

La presencia de una respuesta inmunológica mediada por células se puede determinar mediante ensayos de proliferación (linfocitos T CD4 (+)) o CTL (linfocitos T citotóxicos). Las contribuciones relativas de las respuestas humorales y celulares al efecto protector o terapéutico de un inmunógeno se pueden distinguir aislando por separado las células IgG y los linfocitos T de un animal singénico inmunizado y midiendo el efecto protector o terapéutico en un segundo sujeto.

Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones, los términos "anticuerpo" o "inmunoglobulina" se usan indistintamente, y se refieren a cualquiera de varias clases de proteínas relacionadas estructuralmente que funcionan como parte de la respuesta inmune de un animal o receptor, cuyas proteínas incluyen IgG, IgD, IgE, IgA, IgM y proteínas relacionadas.

En condiciones fisiológicas normales, los anticuerpos se encuentran en el plasma y otros fluidos corporales y en la membrana de ciertas células y son producidos por linfocitos del tipo denominado linfocitos B o su equivalente funcional. Los anticuerpos de la clase IgG están formados por cuatro cadenas polipeptídicas enlazadas entre sí por enlaces disulfuro. Las cuatro cadenas de moléculas de IgG intactas son dos cadenas pesadas idénticas denominadas cadenas H y dos cadenas ligeras idénticas denominadas cadenas L.

Para producir anticuerpos policlonales, se inmuniza un hospedador, tal como un conejo o una cabra, con el antígeno o fragmento de antígeno, en general, con un adyuvante y, si es necesario, se acopla a un vehículo. Los anticuerpos contra el antígeno se recogen posteriormente de los sueros del hospedador. El anticuerpo policlonal puede purificarse por afinidad contra el antígeno convirtiéndolo en mono-específico.

Los anticuerpos monoclonales pueden producirse por hiperinmunización de un donante apropiado con el antígeno o *ex vivo* mediante el uso de cultivos primarios de células esplénicas o estirpes celulares derivadas del bazo (Anavi, 1998; Huston *et al.*, 1991; Johnson *et al.*, 1991; Mernaugh *et al.*, 1995).

5 Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones, la expresión "una parte inmunológica de un anticuerpo" incluye un fragmento Fab de un anticuerpo, un fragmento Fv de un anticuerpo, una cadena pesada de un anticuerpo, una cadena ligera de un anticuerpo, un heterodímero que consiste en una cadena pesada y una
10 cadena ligera de un anticuerpo, un fragmento variable de una cadena ligera de un anticuerpo, un fragmento variable de una cadena pesada de un anticuerpo y una variante monocatenaria de un anticuerpo, que también se conoce como scFv. Además, el término incluye inmunoglobulinas quiméricas que son los productos de expresión de genes fusionados derivados de diferentes especies, una de las especies puede ser un ser humano, en cuyo caso se dice que una inmunoglobulina quimérica está humanizada. Por lo general, una parte inmunológica de un anticuerpo compite con el anticuerpo intacto del que se deriva para la unión específica a un antígeno.

15 Opcionalmente, un anticuerpo o preferentemente una parte inmunológica de un anticuerpo, se puede conjugar químicamente a, o expresarse como, una proteína de fusión con otras proteínas. Para los fines de la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, todas estas proteínas fusionadas se incluyen en la definición de anticuerpos o una parte inmunológica de un anticuerpo.

20 Como se usan en el presente documento, la expresión "agente inmunogénico", o los términos "inmunógeno" o "antígeno" se usan indistintamente para describir una molécula capaz de inducir una respuesta inmunológica contra sí misma en la administración a un receptor, solo, junto con un adyuvante o presentado en un vehículo de presentación.

25 **Composiciones para su uso en un método de tratamiento**

Las composiciones de la invención se pueden usar en métodos de tratamiento de una enfermedad o afección causada por un patógeno estafilocócico. Se puede proporcionar un polipéptido inmunogénico de la invención para inducir una respuesta inmune en una persona infectada con estafilococo o que se sospeche que ha estado expuesta
30 a estafilococos. Se pueden emplear métodos con respecto a los individuos que dieron positivo para la exposición a estafilococos o que se considera que están en riesgo de infección en función de la posible exposición.

En particular, las composiciones de la invención se pueden usar en un método de tratamiento para la infección por estafilococos, en particular, las infecciones nosocomiales adquiridas en el hospital. Las composiciones
35 inmunogénicas y las vacunas de la invención son particularmente ventajosas para su uso en casos de cirugía electiva. Dichos pacientes sabrán la fecha de la cirugía por anticipado, y podrían ser inoculados por anticipado. Las composiciones inmunogénicas y las vacunas de la invención también son ventajosas para su uso en la inoculación de los trabajadores de la atención sanitaria.

40 En algunas realizaciones, la composición se administra en presencia de adyuvantes o vehículos u otros antígenos estafilocócicos. Además, en algunos ejemplos, el tratamiento comprende la administración de otros agentes comúnmente usados contra la infección bacteriana, tales como uno o más antibióticos.

45 El uso de péptidos para la vacunación puede requerir, pero no necesariamente, la conjugación del péptido con una proteína vehículo inmunogénica, tal como el antígeno de superficie de la hepatitis B, la hemocianina de lapa californiana o la albúmina de suero bovino. Los métodos de realización de esta conjugación son bien conocidos en la técnica.

50 **V. VACUNA Y OTRAS COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS Y ADMINISTRACIÓN**

A. Vacunas

La presente invención incluye composiciones para su uso en métodos de prevención o mejora de infecciones estafilocócicas, en particular, infecciones nosocomiales adquiridas en el hospital. La divulgación contempla vacunas
55 para su uso en inmunización tanto activa como pasiva. Las composiciones inmunogénicas, propuestas como adecuadas para su uso como una vacuna, se pueden preparar a partir de uno o varios polipéptido inmunogénico de SpA, tal como una variante del dominio D de SpA o coagulasas inmunogénicas. En otras realizaciones, se pueden usar SpA en combinación con otras proteínas de virulencia secretadas, proteínas de superficie o fragmentos inmunogénicos de las mismas. En ciertos aspectos, el material antigénico se somete extensamente a diálisis para
60 eliminar las moléculas de bajo peso molecular no deseadas y/o se liofiliza para una formulación más preparada en un vehículo deseado.

Otras opciones para una vacuna a base de proteína/péptido implican la introducción de ácidos nucleicos que codifican el/los antígeno/s como vacunas de ADN. En este sentido, informes recientes han descrito la construcción
65 de virus vaccinia recombinantes que expresan bien epítomos de CTL mínimos contiguos (Thomson, 1996) o una combinación de epítomos de linfocitos B, linfocitos T citotóxicos (CTL) y T (auxiliares) (Th) de varios microbios (An,

1997), y el uso exitoso de dichas construcciones para inmunizar ratones para cebar respuestas inmunes protectoras. Por lo tanto, existe amplia evidencia en la bibliografía sobre la utilización exitosa de péptidos, células presentadoras de antígenos pulsadas con péptido (APC) y construcciones que codifican péptidos para el cebado eficaz *in vivo* de respuestas inmunes protectoras. El uso de secuencias de ácidos nucleicos como vacunas se ilustra en las patentes de EE.UU. n.º 5.958.895 y 5.620.896.

La preparación de vacunas que contienen una o varias secuencias de polipéptidos o péptidos como principios activos, en general, se entiende bien en la técnica, como se ilustra en las patentes de EE.UU. n.º 4.608.251; 4.601.903; 4.599.231; 4.599.230; 4.596.792; y 4.578.770. Por lo general, dichas vacunas se preparan como inyectables bien en forma de soluciones o suspensiones líquidas: también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquido antes de la inyección. La preparación también puede ser emulsionada. El ingrediente inmunogénico activo se suele mezclar con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el principio activo. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la vacuna puede contener cantidades de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes de tamponamiento del pH o adyuvantes que mejoran la eficacia de las vacunas. En realizaciones específicas, las vacunas se formulan con una combinación de sustancias, como se describe en las patentes de EE.UU. n.º 6.793.923 y 6.733.754.

Las vacunas se pueden administrar convencionalmente por vía parenteral, mediante inyección, por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular. Las formulaciones adicionales que son adecuadas para otros modos de administración incluyen supositorios y, en algunos casos, formulaciones orales. Para los supositorios, los aglutinantes y vehículos tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos: dichos supositorios pueden formarse a partir de mezclas que contengan el principio activo en el intervalo del aproximadamente 0,5 % al aproximadamente 10 %, preferentemente del aproximadamente 1 % al aproximadamente 2 %. Las formulaciones orales incluyen excipientes normalmente empleados tales como, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio y similares. Estas composiciones adoptan la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones o polvos de liberación sostenida, y contienen del aproximadamente 10 % al aproximadamente 95 % de principio activo, preferentemente del aproximadamente 25 % al aproximadamente 70 %.

Los polipéptidos y las construcciones de ADN que codifican polipéptidos pueden formularse en una vacuna como formas neutras o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres del péptido) y las que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares

Por lo general, las vacunas se administran de una manera compatible con la forma farmacéutica, y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz e inmunogénica. La cantidad que se va a administrar depende del sujeto que se va a tratar, incluyendo la capacidad del sistema inmune del individuo para sintetizar anticuerpos y el grado de protección deseado. Las cantidades precisas de principio activo requeridas para su administración dependen del juicio del médico. Sin embargo, los intervalos de dosificación adecuados son del orden de varios cientos de microgramos de principio activo por vacunación. Las pautas adecuadas para la administración inicial y las inyecciones de refuerzo también son variables, pero están tipificadas por una administración inicial seguida de inoculaciones posteriores u otras administraciones.

La forma de aplicación puede variar ampliamente. Es aplicable cualquiera de los métodos convencionales para la administración de una vacuna. Se cree que estas incluyen la aplicación oral dentro de una base sólida fisiológicamente aceptable o en una dispersión fisiológicamente aceptable, por vía parenteral, mediante inyección y similares. La dosis de la vacuna dependerá de la vía de administración y variará de acuerdo con el tamaño y la salud del sujeto.

En ciertos casos, será deseable tener múltiples administraciones de la vacuna, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6 o más administraciones. Las vacunas pueden ser a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, a 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 intervalos de doce semanas, incluyendo todos los intervalos entre los mismos. Serán deseables los refuerzos periódicos en intervalos de 1 a 5 años para mantener los niveles de protección de los anticuerpos. El curso de la inmunización puede ir seguido de ensayos de anticuerpos contra los antígenos, como se describe en las patentes de EE.UU. n.º 3.791.932; 4.174.384 y 3.949.064.

1. Vehículos

Una composición dada puede variar en su inmunogenicidad. Por lo tanto, suele ser necesario reforzar el sistema inmune del hospedador, como se puede lograr acoplando un péptido o polipéptido a un vehículo. Los vehículos ilustrativos y preferidos son la hemocianina de lapa californiana (KLH) y la albúmina de suero bovino (BSA). También se pueden usar otras albúminas tales como la ovoalbúmina, la albúmina de suero de ratón o la albúmina de suero de conejo como vehículos. Los medios de conjugación de un polipéptido a una proteína vehículo son bien conocidos en la técnica, e incluyen glutaraldehído, éster de *m*-maleimidobencoil-*N*-hidroxysuccinimida, carbodiimida y bencidina

bis-biazotada.

2. Adyuvantes

La inmunogenicidad de las composiciones de polipéptidos o péptidos se puede mejorar mediante el uso de estimulantes inespecíficos de la respuesta inmune, conocidos como adyuvantes. Los adyuvantes adecuados incluyen todos los compuestos inmunoestimulantes aceptables, tales como citocinas, toxinas o composiciones sintéticas. Se pueden usar varios adyuvantes para potenciar una respuesta de anticuerpos contra un polipéptido o coagulasa de variante de SpA, o cualquier otra proteína o combinación bacteriana contemplada en el presente documento. Los adyuvantes pueden (1) atrapar el antígeno en el cuerpo para causar una liberación lenta; (2) atraer células implicadas en la respuesta inmune hacia sitio de administración; (3) inducir la proliferación o activación de células del sistema inmunitario; o (4) mejorar la propagación del antígeno en todo el cuerpo del sujeto.

Los adyuvantes incluyen, pero sin limitación, emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite, sales minerales, polinucleótidos y sustancias naturales. Los adyuvantes específicos que se pueden usar incluyen IL-1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, γ -interferón, GMCSF, BCG, sales de aluminio tales como hidróxido de aluminio u otro compuesto de aluminio, compuestos de MDP tales como thur-MDP y nor-MDP, CGP (MTP-PE), lípido A y monofosforil lípido A (MPL). RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, MPL, dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS) en una emulsión de escualeno/Tween 80 al 2 %. Se pueden usar incluso antígenos del MHC. En las patentes de EE.UU. n.º 6.814.971, 5.084.269, 6.656.462, se ilustran otros adyuvantes o métodos.

Diversos métodos para lograr un efecto adyuvante para la vacuna incluyen el uso de agentes tales como hidróxido de aluminio o fosfato (alumbre), comúnmente usados como una solución del aproximadamente 0,05 al aproximadamente 0,1 % en salina tamponada con fosfato, mezcla con polímeros sintéticos de azúcares (Carbopol®) usados como una solución al aproximadamente 0,25 %, agregación de la proteína en la vacuna mediante el tratamiento térmico con temperaturas que varían entre aproximadamente 70 °C y aproximadamente 101 °C durante un período de 30 segundos a 2 minutos, respectivamente. También se puede emplear para producir un efecto adyuvante la agregación mediante reactivación con anticuerpos tratados con pepsina (Fab) contra la albúmina; la mezcla con células bacterianas (por ejemplo, *C. parvum*), endotoxinas o componentes lipopolisacáridos de bacterias Gram-negativas; la emulsión en vehículos oleosos fisiológicamente aceptables (por ejemplo, mono-oleato de manida (Aracel A)); o la emulsión con una solución al 20 % de un perfluorocarbono (Fluosol-DA®) usada como un sustituto del bloque.

Los ejemplos de adyuvantes que se suelen preferir incluyen adyuvante de Freund completo (un estimulante no específico de la respuesta inmune que contiene *Mycobacterium tuberculosis* muerta), adyuvantes de Freund incompletos e hidróxido de aluminio.

En algunos aspectos, se prefiere que el adyuvante se seleccione para que sea un inductor preferido de un tipo de respuesta Th1 o Th2. Los niveles altos de citocinas de tipo Th1 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunitarias mediadas por células a un antígeno dado, mientras que los niveles elevados de citocinas de tipo Th2 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunes humorales al antígeno.

La distinción de la respuesta inmune Th1 y Th2 no es absoluta. En realidad, un individuo apoyará una respuesta inmune que se describe como predominantemente Th1 o predominantemente Th2. Sin embargo, a menudo es conveniente considerar las familias de citocinas en términos de lo descrito en los clones de linfocitos T CD4+ murinos por Mosmann y Coffman (Mosmann y Coffman, 1989). Tradicionalmente, las respuestas de tipo Th1 están asociadas con la producción de las citocinas INF- γ e IL-2 por los linfocitos T. Otras citocinas que se suelen asociar directamente con la inducción de respuestas inmunes de tipo Th1 no son producidas por linfocitos T, tales como IL-12. Por el contrario, las respuestas de tipo Th2 están asociadas con la secreción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10.

Además de los adyuvantes, se puede desear administrar conjuntamente modificadores de respuesta biológica (BRM) para potenciar las respuestas inmunes. Se ha demostrado que los BRM regulan positivamente la inmunidad de los linfocitos T o regulan negativamente la actividad de las células supresoras. Dichas BRM incluyen, pero sin limitación, cimetidina (CIM, 1200 mg/d) (Smith/Kline, PA); o dosis bajas de ciclofosfamida (CYP; 300 mg/m²) (Johnson/Mead, NJ) y citocinas tales como γ -interferón, IL-2 o IL-12 o genes que codifican las proteínas implicadas en funciones de ayuda inmunitaria, tales como B-7.

B. Componentes y fracciones lipídicas

En el presente documento, se desvelan composiciones que comprenden uno o más lípidos asociados con un ácido nucleico o un polipéptido/péptido. Un lípido es una sustancia que es insoluble en agua y extraíble con un disolvente orgánico. El experto en la materia entiende por lípidos a los compuestos distintos a los descritos específicamente en el presente documento, y son englobados por las composiciones y los métodos de la presente divulgación. Un componente lipídico y un componente no lipídico pueden unirse entre sí, bien de forma covalente o de forma no covalente.

Un lípido puede ser un lípido de origen natural o un lípido sintético. Sin embargo, un lípido es habitualmente una sustancia biológica. Los lípidos biológicos se conocen bien en la técnica, e incluyen, por ejemplo, grasas neutras, fosfolípidos, fosfoglicéridos, esteroides, terpenos, lisolípidos, glucoesfinolípidos, glucolípidos, sulfatidas, lípidos con ácidos grasos enlazados por éter y éster, y lípidos polimerizables, y combinaciones de los mismos.

Una molécula de ácido nucleico o un polipéptido/péptido, asociado con un lípido puede dispersarse en una solución que contiene un lípido, disolverse con un lípido, emulsionarse con un lípido, mezclarse con un lípido, combinarse con un lípido, unirse covalentemente con un lípido, estar contenido como una suspensión en un lípido o asociado de otro modo a un lípido. Una composición asociada a un lípido o lípido-poxvirus de la presente divulgación no se limita a ninguna estructura en particular. Por ejemplo, se pueden entremezclar simplemente en una solución, posiblemente formando agregados que no sean uniformes ni en tamaño ni en forma. En otro ejemplo, pueden estar presentes en una estructura bicapa, como micelos o con una estructura "hundida". En otro ejemplo no limitante, también se contempla un complejo de lipofectamina (Gibco BRL)-poxvirus o Superfect (Qiagen)-poxvirus.

En ciertas realizaciones, una composición puede comprender aproximadamente 1 %, aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 7 %, aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 9 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 11 %, aproximadamente el 12 %, aproximadamente el 13 %, aproximadamente el 14 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 16 %, aproximadamente el 17 %, aproximadamente el 18 %, aproximadamente el 19 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 21 %, aproximadamente el 22 %, aproximadamente el 23 %, aproximadamente el 24 %, aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 26 %, aproximadamente el 27 %, aproximadamente el 28 %, aproximadamente el 29 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 31 %, aproximadamente el 32 %, aproximadamente el 33 %, aproximadamente el 34 %, aproximadamente el 35 %, aproximadamente el 36 %, aproximadamente el 37 %, aproximadamente el 38 %, aproximadamente el 39 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 41 %, aproximadamente el 42 %, aproximadamente el 43 %, aproximadamente el 44 %, aproximadamente el 45 %, aproximadamente el 46 %, aproximadamente el 47 %, aproximadamente el 48 %, aproximadamente el 49 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 51 %, aproximadamente el 52 %, aproximadamente el 53 %, aproximadamente el 54 %, aproximadamente el 55 %, aproximadamente el 56 %, aproximadamente el 57 %, aproximadamente el 58 %, aproximadamente el 59 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 61 %, aproximadamente el 62 %, aproximadamente el 63 %, aproximadamente el 64 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 66 %, aproximadamente el 67 %, aproximadamente el 68 %, aproximadamente el 69 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 71 %, aproximadamente el 72 %, aproximadamente el 73 %, aproximadamente el 74 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 76 %, aproximadamente el 77 %, aproximadamente el 78 %, aproximadamente el 79 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 81 %, aproximadamente el 82 %, aproximadamente el 83 %, aproximadamente el 84 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 86 %, aproximadamente el 87 %, aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 %, de un determinado tipo de lípido o componente no lipídico tal como un adyuvante, antígeno, péptido, polipéptido, azúcar, ácido nucleico u otros materiales desvelados en el presente documento o conocidos por un experto en la materia. En un ejemplo no limitante, una composición puede comprender del aproximadamente 10 % al aproximadamente 20 % de lípidos neutros, y del aproximadamente 33 % al aproximadamente 34 % de una cerebroside, y aproximadamente el 1 % de colesterol. En otro ejemplo no limitante, un liposoma puede comprender del aproximadamente 4 % al aproximadamente 12 % de terpenos, en el que aproximadamente un 1 % de la micela es específicamente licopeno, dejando del aproximadamente 3 % al aproximadamente 11 % del liposoma comprendiendo otros terpenos; y del aproximadamente 10 % al aproximadamente 35 % de fosfatidil colina, y aproximadamente el 1 % de un componente no lipídico. Por lo tanto, se contempla que las composiciones de la presente invención pueden comprender cualquiera de los lípidos, tipos de lípidos u otros componentes en cualquier combinación o intervalo de porcentajes.

C. Terapia de combinación

Las composiciones y los métodos relacionados de la presente invención, en particular, la administración de un factor de virulencia secretado o una proteína de superficie, incluyendo un péptido o polipéptido de variante de SpA, y/o otros péptidos o proteínas bacterianos a un paciente/sujeto, también se pueden usar en combinación con la administración de terapias tradicionales. Estas incluyen, pero sin limitación, la administración de antibióticos tales como estreptomicina, ciprofloxacino, doxiciclina, gentamicina, cloranfenicol, trimetoprima, sulfametoxazol, ampicilina, tetraciclina o diversas combinaciones de antibióticos.

En un aspecto, se contempla que una vacuna y/o terapia de polipéptidos se utilice en combinación con tratamiento antibacteriano. Como alternativa, la terapia puede preceder o ir después del tratamiento con el otro agente en intervalos que varían de minutos a semanas. En realizaciones en las que los otros agentes y/o proteínas o polinucleótidos se administran por separado, debería garantizarse, en general, que no transcurra un período de tiempo significativo entre el momento de cada administración, de manera que el agente y la composición antigénica sigan siendo capaces de ejercer un efecto combinado de forma ventajosa en el sujeto. En dichos casos, se

contempla que es posible administrar ambas modalidades dentro de aproximadamente 12-24 h entre sí o dentro de aproximadamente 6-12 h entre sí. En algunas situaciones, se puede desear prolongar el período de tiempo para la administración de forma significativa, donde hay un lapso de varios días (2, 3, 4, 5, 6 o 7) a varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8) entre las respectivas administraciones.

Se pueden emplear diversas combinaciones, por ejemplo, la terapia con antibióticos es "A" y la molécula inmunogénica proporcionada como parte de un régimen de terapia inmune, tal como un antígeno, es "B":

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B

B/A/B/B B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A.

La administración de composiciones inmunogénicas de la presente invención a un paciente/sujeto seguirá protocolos generales para la administración de dichos compuestos, teniendo en cuenta la toxicidad, si la hubiera, de la composición de SpA, u otras composiciones descritas en el presente documento. Se espera que los ciclos de tratamiento se repitan según sea necesario. También se contempla la aplicación de diversas terapias convencionales, tales como la hidratación, en combinación con la terapia descrita.

D. Composiciones farmacéuticas generales

En algunos aspectos de la divulgación, las composiciones farmacéuticas se administran a un sujeto. Diferentes aspectos de la presente divulgación implican la administración de una cantidad eficaz de una composición a un sujeto. Se pueden administrar antígenos estafilocócicos, miembros de la vía Ess, incluyendo polipéptidos o péptidos de la clase Esa o Esx, y/o miembros de sustratos de sortasa al paciente para protegerle contra la infección por uno o más patógenos de estafilococos. Como alternativa, se puede dar un vector de expresión que codifica uno o más de dichos polipéptidos o péptidos a un paciente como un tratamiento preventivo. Además, dichos compuestos se pueden administrar en combinación con un antibiótico o un agente antibacteriano. En general, dichas composiciones se disuelven o se dispersan en un vehículo farmacéuticamente aceptable o un medio acuoso.

Además de los compuestos formulados para la administración parenteral, tales como para inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, comprimidos u otros sólidos para la administración por vía oral; cápsulas de liberación controlada; y cualquier otra forma usada en la actualidad, incluyendo cremas, lociones, enjuagues bucales, inhaladores y similares.

Los compuestos activos de la presente invención se pueden formular para su administración por vía parenteral, por ejemplo, formularse para la inyección por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea o incluso intraperitoneal. Los expertos en la materia conocerán la preparación de una composición acuosa que contenga un compuesto o compuestos que aumenten la expresión de una molécula MHC de clase I a la luz de la presente divulgación. Por lo general, dichas composiciones se pueden preparar como inyectables, bien como soluciones o suspensiones líquidas; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para su uso en la preparación de soluciones o suspensiones tras la adición de un líquido antes de la inyección; y, los preparados también se pueden emulsionar.

Se pueden preparar en agua soluciones de los compuestos activos como bases libres o sales farmacológicamente aceptables, mezcladas de forma adecuada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estos preparados contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

Las formas farmacéuticas adecuadas para su uso como inyectables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles; las formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta un grado en el que se pueda inyectar fácilmente. Debe ser estable en condiciones de fabricación y almacenamiento, y se debe conservar contra la acción contaminante de microorganismos tales como las bacterias y los hongos.

Las composiciones proteináceas pueden formularse en forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y las que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. También se pueden obtener sales formadas con los grupos carboxilo libres a partir de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxido de sodio, de potasio, de amonio, de calcio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

El vehículo también puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y

aceites vegetales. Se puede mantener una fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula adecuado en el caso de una dispersión, y mediante el uso de tensioactivos. Se puede lograr la prevención de la acción de microorganismos mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. Se puede alcanzar la absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante el uso en las composiciones de agentes retardantes de la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Se preparan soluciones inyectables estériles incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente adecuado con diversos de los demás ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de una esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los demás ingredientes necesarios de los que se han enumerado anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de las soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son las técnicas de secado al vacío y liofilización, que producen un polvo del principio activo, más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución del mismo previamente esterilizada por filtración.

La administración de las composiciones de acuerdo con la presente invención normalmente será a través de cualquier vía habitual. Esto incluye, pero sin limitación, la administración oral, nasal o bucal. Como alternativa, la administración puede ser por inyección ortotópica, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intranasal o intravenosa. En ciertas realizaciones, una composición vacunal se puede inhalar (por ejemplo, la patente de EE.UU. 6.651.655). Dichas composiciones se administrarían normalmente como composiciones farmacéuticamente aceptables que incluyen vehículos fisiológicamente aceptables, tampones u otros excipientes. Como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas farmacéuticas que son, dentro del alcance de un juicio médico fiable, adecuados para entrar en contacto con tejidos humanos y animales sin una excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otras complicaciones problemáticas en proporción con una relación beneficio/riesgo razonable. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable", significa un material, una composición o un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga líquida o sólida, diluyente, excipiente, disolvente o material encapsulante, implicado en portar o transportar un agente químico.

Para la administración por vía parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe estar tamponada de forma adecuada, si fuera necesario, y el diluyente líquido debe volverse isotónico primero con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas en particular son especialmente adecuadas para la administración por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. En este sentido, los medios acuosos estériles que se pueden emplear resultarán conocidos para los expertos en la materia a la luz de la presente divulgación. Por ejemplo, se podría disolver una dosis en una solución de NaCl isotónica, y bien añadirse a un fluido de hipodermoclasia o inyectarse en el sitio propuesto de la infusión, (véase por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences", 1990). Algunas variaciones en la dosis serán necesarias dependiendo del estado del sujeto. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individualmente.

Se determina una cantidad eficaz de la composición terapéutica o profiláctica basándose en el objetivo deseado. La expresión "dosis unitaria" o "dosificación" se refiere a unidades físicamente diferenciadas adecuadas para su uso en un sujeto, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de la composición calculada para producir las respuestas deseadas tratadas anteriormente en asociación con la administración, es decir, la vía y el régimen adecuados. La cantidad que se va a administrar, tanto de acuerdo con una serie de tratamientos como con una dosis unitaria, depende de la protección deseada.

Las cantidades exactas de la composición también dependen del juicio del profesional sanitario y son específicas para cada individuo. Los factores que afectan a la dosis incluyen el estado físico y clínico del sujeto, la vía de administración, el objetivo deseado del tratamiento (alivio de los síntomas frente a curación), y la potencia, estabilidad y toxicidad de la composición en particular.

Tras la formulación, se administrarán las soluciones de manera compatible con la forma farmacéutica y en una cantidad tal que sea terapéutica o profilácticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas farmacéuticas, tales como el tipo de soluciones inyectables que se han descrito anteriormente.

E. Administración *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*

Como se usa en el presente documento, la expresión administración *in vitro* se refiere a manipulaciones realizadas en células extraídas de o fuera de un sujeto, incluyendo, pero sin limitación, células en cultivo. La expresión administración *ex vivo* se refiere a células que han sido manipuladas *in vitro*, y que se administran posteriormente a un sujeto. La expresión administración *in vivo* incluye todas las manipulaciones realizadas en un sujeto.

En ciertos aspectos de la presente divulgación, las composiciones se pueden administrar bien *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. En ciertos aspectos *in vitro*, se incuban estirpes celulares de linfocitos B autólogos con un vector vírico de la

presente invención durante 24 a 48 horas, o con una variante de SpA y/o coagulasa y/o cualquier otra composición descrita en el presente documento durante dos horas. A continuación, las células transducidas se pueden usar para su análisis *in vitro* o, como alternativa, para su administración *ex vivo*. Las patentes de EE.UU. n.º 4.690.915 y 5.199.942, desvelan métodos para la manipulación *ex vivo* de células mononucleares sanguíneas y células de la médula ósea para su uso en aplicaciones terapéuticas.

F. Anticuerpos e inmunización pasiva

Otro aspecto de la divulgación es un método de preparación de una inmunoglobulina para su uso en la prevención o el tratamiento de la infección estafilocócica que comprende las etapas de inmunizar a un receptor o donante con la vacuna de la invención y aislar la inmunoglobulina del receptor o donante. Una inmunoglobulina preparada mediante este método es un aspecto adicional de la divulgación. Una composición farmacéutica que comprende la inmunoglobulina de la divulgación y un vehículo farmacéuticamente aceptable es un aspecto adicional que se podría usar en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la enfermedad estafilocócica. Se desvelan además composiciones para su uso en un método de tratamiento o prevención de la infección por estafilococos que comprende una etapa de administrar a un paciente una cantidad eficaz de la preparación farmacéutica de la invención.

Los inóculos para la producción de anticuerpos policlonales normalmente se preparan dispersando la composición antigénica en un diluyente fisiológicamente tolerable tal como solución salina u otros adyuvantes adecuados para uso humano para formar una composición acuosa. Se administra una cantidad inmunoestimulante de inóculo a un mamífero, y el mamífero inoculado se mantiene luego durante un tiempo suficiente para que la composición antigénica induzca anticuerpos protectores.

Los anticuerpos se pueden aislar en la medida deseada mediante técnicas bien conocidas tales como la cromatografía de afinidad (Harlow y Lane, 1988). Los anticuerpos pueden incluir preparados de antisero de una variedad de animales de uso común, por ejemplo, cabras, primates, burros, cerdos, caballos, cobayas, ratas u seres humanos.

Una inmunoglobulina producida de acuerdo con la divulgación puede incluir anticuerpos completos, fragmentos de anticuerpos o subfragmentos. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas completas de cualquier clase (por ejemplo, IgG, IgM, IgA, IgD o IgE), anticuerpos quiméricos o anticuerpos híbridos con doble especificidad para dos o más antígenos de la invención. También pueden ser fragmentos (por ejemplo, F(ab')₂, Fab', Fab, Fv y similares) que incluyen fragmentos híbridos. Una inmunoglobulina también incluye proteínas naturales, sintéticas o modificadas genéticamente que actúan como un anticuerpo uniéndose a antígenos específicos para formar un complejo.

Una vacuna de la presente invención se puede administrar a un receptor que luego actúa como una fuente de inmunoglobulina, producida en respuesta a la exposición de la vacuna específica. Un sujeto así tratado donaría plasma a partir del que se obtendría la globulina hiperinmune mediante la metodología de fraccionamiento de plasma convencional. La globulina hiperinmune se administraría a otro sujeto para conferir resistencia contra o tratar la infección por estafilococos. Las globulinas hiperinmunes son particularmente útiles para el tratamiento o la prevención de la enfermedad estafilocócica en bebés, individuos inmunodeprimidos o cuando se requiere tratamiento y no hay tiempo para que el individuo produzca anticuerpos en respuesta a la vacunación.

Un aspecto adicional de la divulgación es una composición farmacéutica que comprende dos de más anticuerpos monoclonales (o fragmentos de los mismos, preferentemente humanos o humanizados) reactivos contra al menos dos constituyentes de la composición inmunogénica de la invención, que se podrían usar para tratar o prevenir la infección por bacterias Gram-positivas, preferentemente estafilococos, más preferentemente *S. aureus* o *S. epidermidis*. Dichas composiciones farmacéuticas comprenden anticuerpos monoclonales que pueden ser inmunoglobulinas enteras de cualquier clase, anticuerpos quiméricos o anticuerpos híbridos con especificidad hacia dos o más antígenos de la invención. También pueden ser fragmentos (por ejemplo, F(ab')₂, Fab', Fab, Fv y similares) que incluyen fragmentos híbridos.

Los métodos de fabricación de anticuerpos monoclonales son bien conocidos en la técnica, y pueden incluir la fusión de esplenocitos con células de mieloma (Kohler y Milstein, 1975, Harlow y Lane, 1988). Como alternativa, pueden obtenerse fragmentos Fv monoclonales rastreando una biblioteca de presentación en fagos adecuada (Vaughan *et al.*, 1998). Los anticuerpos monoclonales pueden ser humanizados o parcialmente humanizados mediante los métodos conocidos.

VI. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se dan con el fin de ilustrar diversas realizaciones de la invención. Un experto en la materia apreciará fácilmente que la presente invención está bien adaptada para llevar a cabo los objetos, y obtener los fines y ventajas mencionadas, así como aquellos objetos, fines y ventajas inherentes en el presente documento. Los presentes ejemplos, junto con los métodos descritos en el presente documento son actualmente representativos de realizaciones preferidas.

EJEMPLO 1

VARIANTES DE LA PROTEÍNA A NO TOXIGÉNICA COMO VACUNAS SUBUNITARIAS PARA PREVENIR INFECCIONES POR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

A. RESULTADOS

Modelo animal para una infección por *S. aureus*. Se infectaron ratones BALB/c mediante inyección intravenosa con 1×10^7 UFC del aislado clínico humano de *S. aureus* Newman (Baba *et al.*, 2007). En un período de 6 horas después de la infección, desapareció el 99,999 % de los estafilococos de la corriente sanguínea y se distribuyeron a través de la vasculatura. La diseminación estafilocócica a los tejidos periféricos se produjo rápidamente, a medida que la carga bacteriana en el riñón y otros tejidos de órganos periféricos alcanzó un valor 1×10^5 UFC/g en las tres primeras horas. La carga estafilocócica en los tejidos del riñón aumentó en 1,5 log de UFC en veinticuatro horas. Cuarenta y ocho horas después de la infección, los ratones desarrollaron abscesos diseminados en múltiples órganos, detectables mediante microscopía óptica de tejido renal en secciones finas y teñido con hematoxilina-eosina. El diámetro inicial de los abscesos fue de $524 \mu\text{M}$ ($\pm 65 \mu\text{M}$); se marcaron inicialmente las lesiones mediante un influjo de leucocitos polimorfonucleares (PMN) y no albergaban ninguna organización de estafilococos discernible, la mayoría de los cuales parecían residir dentro de los PMN. El día 5 de la infección, los abscesos aumentaron de tamaño y encerraron una población central de estafilococos, rodeada por una capa de material amorfo eosinófilo y una gran masa de PMN. La histopatología reveló una necrosis masiva de PMN en la proximidad del nido estafilocócico en el centro de las lesiones de abscesos, además de una capa de fagocitos sanos. Se observó un borde de PMN necróticos en la periferia de las lesiones de abscesos, bordeando material eosinófilo, amorfo que separa el tejido renal sano de las lesiones. Finalmente, los abscesos alcanzaron un diámetro de $\geq 1,524 \mu\text{M}$ en el día 15 o 36. En intervalos de tiempo posteriores, la carga estafilocócica se aumentó a 10^4 - 10^6 UFC/g y las lesiones de abscesos en crecimiento migraron hacia la cápsula del órgano. Las lesiones periféricas tendían a la ruptura, liberando de este modo material necrótico y estafilococos en la cavidad peritoneal o el espacio retroperitoneal. Estos eventos dieron como resultado una bacteriemia además de una onda secundaria de abscesos, lo que dio lugar finalmente a un desenlace letal.

Para enumerar la carga estafilocócica en el tejido renal, se sacrificaron los animales, se extirparon los riñones y el tejido homogenizado se extendió sobre medio de agar para la formación de colonias. En el día 5 de la infección, se observó una media de 1×10^6 de UFC/g de tejido renal para *S. aureus* Newman. Para cuantificar la formación de abscesos, se examinaron los riñones a simple vista, y se otorgó a cada órgano individual una puntuación de uno o cero. Se dividió la suma final entre el número total de riñones para calcular el porcentaje de abscesos en la superficie (Tabla 4). Además, se fijaron unos riñones escogidos aleatoriamente en formalina, se embebieron, se prepararon en secciones finas y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Para cada riñón, se observaron por microscopía cuatro secciones sagitales en intervalos de $200 \mu\text{M}$. Se contaron los números de lesiones para cada sección y se calculó la media para cuantificar el número de abscesos dentro de los riñones. El *S. aureus* Newman causó $4,364 \pm 0,889$ de abscesos por riñón, y se observaron abscesos en la superficie en 14 de 20 riñones (70 %) (Tabla 4).

Cuando se examinó mediante microscopio de barrido electrónico, se situó *S. aureus* Newman en césped estrechamente asociado en el centro de los abscesos. Los estafilococos estaban contenidos por pseudocápsulas amorfas que separaban las bacterias de la masa de leucocitos de los abscesos. No se observaron células inmunes en estos nidos centrales de estafilococos, sin embargo, se situaron glóbulos rojos ocasionales entre las bacterias. Las poblaciones bacterianas del centro de los abscesos, designadas comunidades de abscesos estafilocócicas (SAC), se mostraron homogéneas y recubiertas por un material granular denso en electrones. La cinética del aspecto de las lesiones infecciosas y los atributos morfológicos de los abscesos formados por *S. aureus* Newman fueron similares a lo observado tras la infección del ratón con *S. aureus* USA300 (LAC), el actual clon de *S. aureus* epidémico resistente a meticilina adquirido en la comunidad (CA-MRSA) en Estados Unidos (Diep *et al.*, 2006).

Tabla 4. Requisitos genéticos para la formación de abscesos de *S. aureus* Newman en ratones

Genotipo	Carga estafilocócica en tejido renal			Formación de abscesos en tejido renal		
	^a log ₁₀ de UFC/g de tejido	^b Significancia (valor p)	^c Reducción (log ₁₀ de UFC/g)	^d Abscesos superficiales (%)	^e Número de abscesos por riñón	^f Significancia (valor p)
Tipo silvestre	6,141 $\pm$ 0,192			70	4,364 $\pm$ 0,889	
Δ srtA	4,095 $\pm$ 0,347	6,4 $\times 10^{-6}$	2,046	0	0,000 $\pm$ 0,000	0,0216
spa	5,137 $\pm$ 0,347	0,0144	1,004	13	0,375 $\pm$ 0,374	0,0356

Genotipo	Carga estafilocócica en tejido renal			Formación de abscesos en tejido renal		
	^a log ₁₀ de UFC/g de tejido	^b Significancia (valor <i>p</i>)	^c Reducción (log ₁₀ de UFC/g)	^d Abscesos superficiales (%)	^e Número de abscesos por riñón	^f Significancia (valor <i>p</i>)

^aMedias de la carga estafilocócica calculada como el log₁₀ de UFC/g en tejidos renales homogenizados 5 días después de la infección en cohortes de quince ratones BALB/c por cepa de exposición. Se indica el error típico de las medias (±ETM).

^bLa significación estadística se calculó con la prueba t de Student y se registraron los valores de *p*; los valores de *p* < 0,05 se consideraron significativos.

^cReducción en la carga bacteriana calculada como log₁₀ de UFC/g.

^dLa formación de abscesos en tejidos renales cinco días después de la infección es midió mediante inspección macroscópica (% positivo).

^eHistopatología de secciones delgadas de riñón teñidas con hematoxilina-eosina de ocho a diez animales; se registró el número medio de abscesos por riñón y volvió a promediar para la obtención de la media final (±ETM).

^fLa significación estadística se calculó con la prueba t de Student y se registraron los valores de *p*; los valores de *p* < 0,05 se consideraron significativos.

Los mutantes de la proteína A (*spa*) de *S. aureus* son avirulentos y no pueden formar abscesos. La Sortasa A es una transpeptidasa que inmoviliza diecinueve proteínas de superficie en la envoltura de la cepa Newman de *S. aureus* (Mazmanian *et al.*, 1999; Mazmanian *et al.*, 2000). Las obras anteriores han identificado a la sortasa A como un factor de virulencia en múltiples sistemas de modelos de animales, sin embargo, las contribuciones de esta enzima y sus proteínas de superficie ancladas para la formación o persistencia de abscesos todavía no se han desvelado (Jonsson *et al.*, 2002; Weiss *et al.*, 2004). En comparación con la cepa parental de tipo silvestre (Baba *et al.*, 2007), una variante isogénica *srtA* ($\Delta srtA$) no formó lesiones de abscesos ni en el examen macroscópico ni en la histopatología en los días 2, 5 o 15. En los ratones infectados con el mutante de *srtA*, solo se recuperaron 1×10^4 UFC/g del tejido renal en el día 5 de la infección que es una reducción de 2,046 log₁₀ de UFC/g en comparación con la cepa parental de tipo silvestre ($p = 6,73 \times 10^{-6}$). Se observó un defecto similar para el mutante de *srtA* de la cepa USA300 de MRSA (datos no mostrados). El microscopio de barrido electrónico mostró que los mutantes de *srtA* se encontraban muy dispersados y a menudo asociados con leucocitos en tejido renal saludable. El día quince después de la infección, los mutantes de *srtA* se eliminaron de los tejidos renales, una reducción $\geq 3,5$ log₁₀ UFC/g en comparación con el tipo silvestre (Tabla 3). Por lo tanto, las proteínas de superficie ancladas por la sortasa A permiten la formación de lesiones de abscesos y la persistencia de bacterias en los tejidos del hospedador, en los que los estafilococos se reproducen como comunidades embebidas en una matriz extracelular y protegidos de los leucocitos por una pseudocápsula amorfa.

La sortasa A ancla un gran espectro de proteínas con señales de clasificación del motivo LPXTG a la envoltura de la pared celular, proporcionando así a la superficie de presentación de muchos factores de virulencia (Mazmanian *et al.*, 2002). Para identificar las proteínas de superficie necesarias para la formación de abscesos estafilocócicos, se introdujeron inserciones de bursa aurealis en secuencias de codificación 5' de genes que codifican polipéptidos con proteínas del motivo LPXTG (Bae *et al.*, 2004) y estas mutaciones se transdujeron en *S. aureus* Newman. Las mutaciones en el gen estructural para la proteína A (*spa*) redujo la carga estafilocócica en tejidos de riñón de ratón infectados en un valor 1,004 log₁₀ ($p = 0,0144$). Cuando se analizaron para determinar su capacidad para formar abscesos en tejidos renales mediante histopatología, se observó que los mutantes de *spa* no fueron capaces de formar abscesos en comparación con la cepa parental de tipo silvestre de *S. aureus* Newman ($4,364 \pm 0,889$ abscesos de *S. aureus* Newman por riñón frente a la mutante de *spa* isogénica con $0,375 \pm 0,374$ lesiones; $p = 0,0356$).

La proteína A bloquea las respuestas inmunes innatas y adaptativas. Algunos estudios han identificado la proteína A como un factor de virulencia de vital importancia durante la patogénesis de las infecciones por *S. aureus*. Las obras anteriores demostraron que la proteína A impide la fagocitosis de los estafilococos uniendo el componente Fc de la inmunoglobulina (Jensen 1958; Uhlén *et al.*, 1984), activa la agregación de plaquetas a través del factor de Von Willebrand (Hartleib *et al.*, 2000), funciona como un superantígeno de linfocitos B capturando la región F(ab)₂ de IgM portadora de VH3 (Roben *et al.*, 1995) y, a través de su activación del TNFR1, puede iniciar la neumonía estafilocócica (Gomez *et al.*, 2004). Debido al hecho de que la proteína A captura la inmunoglobulina y muestra atributos tóxicos, no se ha seguido de manera rigurosa la posibilidad de que esta molécula de superficie pueda funcionar como una vacuna en los seres humanos. Los inventores demuestran por primera vez que las variantes de la proteína A que ya no son capaces de unirse a las inmunoglobulinas, vWF y TNFR-1, se eliminan de su potencial toxigénico y son capaces de estimular respuestas inmunes humores que protegen contra enfermedades estafilocócicas.

Base molecular de la función y presentación en la superficie de la proteína A. La proteína A se sintetiza como precursor en el citoplasma bacteriano y se secreta a través de su péptido señal YSIK en su pared transversal, es decir, el septo de división celular de los estafilococos (FIG. 1) (DeDent *et al.*, 2007; DeDent *et al.*, 2008). Tras la escisión de la señal de clasificación LPXTG C-terminal, la proteína A se ancla a puentes transversales del péptidoglicano bacteriano mediante la sortasa A (Schneewind *et al.*, 1995; Mazmanian *et al.*, 1999; Mazmanian *et al.*, 2000). La proteína A es la proteína de superficie más abundante de los estafilococos; la molécula es expresada

por casi todas las cepas de *S. aureus* (Saïd-Salim *et al.*, 2003; Cespedes *et al.*, 2005; Kennedy *et al.*, 2008). Los estafilococos giran en torno al 15-20 % de su pared celular por ciclo de división (Navarre y Schneewind, 1999). Las hidrolasas murinas escinden las cadenas de glicano y los péptidos de la pared del péptidoglicano, liberando de este modo la proteína A con su tetrapéptido disacárido de la pared celular C-terminal hacia el medio extracelular (Ton-That *et al.*, 1999). Por tanto, mediante su diseño fisiológico, la proteína A tanto se ancla a la pared celular como se muestra sobre la superficie bacteriana, pero también se libera hacia los tejidos circundantes durante la infección del hospedador (Marraffini *et al.*, 2006).

La proteína A captura inmunoglobulinas en la superficie bacteriana y esta actividad bioquímica permite el escape estafilocócico de las respuestas inmunes innatas y adquiridas del huésped (Jensen 1958; Goodyear y Silverman 2004). Lo interesante es que la región X de la proteína A (Guss *et al.*, 1984), un dominio de repetición que une los dominios de unión a IgG a la señal de clasificación LPXTG/anclaje a la pared celular, es quizás la parte más variable del genoma estafilocócico (Schneewind *et al.*, 1992; Saïd-Salim *et al.*, 2003). Cada uno de los cinco dominios de unión a la inmunoglobulina de la proteína A (SpA), formados a partir de haces de tres hélices y denominados E, D, A, B y C, ejerce propiedades funcionales y estructurales similares (Sjödahl 1977; Jansson *et al.*, 1998). La estructura cristalina y en solución del dominio D se ha resuelto con y sin los ligandos Fc y VH3 (Fab), que se unen a la proteína A de una forma no competitiva en distintos sitios (Graille *et al.*, 2000).

En el complejo de estructura cristalina, Fab interactúa con la hélice II y la hélice III del dominio D a través de una superficie compuesta de cuatro cadenas β de la región VH (Graille *et al.*, 2000). El eje principal de la hélice II del dominio D es de aproximadamente 50° con respecto a la orientación de las cadenas, y la parte interhelicoidal del dominio D es la más próxima a la cadena C0. El sitio de interacción en Fab se encuentra apartado de la región constante de la cadena pesada y la cadena ligera de la Ig. La interacción implica los siguientes restos del dominio D: Asp-36 de la hélice II, así como Asp-37 y Gln-40 en el bucle entre la hélice II y la hélice III, además de otros restos diversos con SpA-D (Graille *et al.*, 2000). Ambas superficies de interacción se componen predominantemente de cadenas laterales polares, con tres restos de carga negativa en el dominio D y dos restos de carga positiva en Fab 2A2 enterrado por la interacción, lo que proporciona una atracción electrostática global entre las dos moléculas. De las cinco interacciones polares identificadas entre Fab y el dominio D, tres son entre las cadenas laterales. Se forma un puente de sal entre Arg-H19 y Asp-36, y se realizan dos enlaces de hidrógeno entre Tyr-H59 y Asp-37, y entre Asn-H82a y Ser-33. Debido a la conservación de Asp-36 y Asp-37 en los cinco dominios de unión a IgG de la proteína A, estos residuos se seleccionaron para la mutagénesis.

Los sitios SpA-D responsables de la unión a Fab se encuentran estructuralmente separados de la superficie del dominio que media en la unión a Fc γ . La interacción de Fc γ con el dominio B implica principalmente a los restos en la hélice I, con una menor implicación de la hélice II (Deisenhofer 1981; Gouda *et al.*, 1992). A excepción de Gln-32, un contacto de poca importancia en ambos complejos, ninguno de los restos que median en la interacción de Fc γ participa en la unión a Fab. Para examinar la relación espacial entre estos diferentes sitios de unión a Ig, se han superpuesto los dominios de SpA en estos complejos para construir un modelo de un complejo entre Fab, el dominio D de SpA y la molécula Fc γ . En este modelo ternario, Fab y Fc γ forman una estructura de tipo sándwich en torno a las caras opuestas de la hélice II sin evidencia de impedimento estérico de ninguna de las interacciones. Dichos hallazgos ilustran cómo, a pesar de su pequeño tamaño (es decir, 56-61 aa), un dominio de SpA puede mostrar simultáneamente ambas actividades, lo que explica la evidencia experimental de que las interacciones de Fab con un dominio individual son no-competitivas. Los restos para la interacción entre SpA-D y Fc γ son Gln-9 y Gln-10.

Por el contrario, la ocupación de la parte Fc de IgG en el dominio D bloquea su interacción con el vWF A1 y probablemente también el TNFR1 (O'Seaghdha *et al.*, 2006). Las mutaciones en los restos esenciales para la unión a Fc de IgG (F5, Q9, Q10, S11, F13, Y14, L17, N28, I31 y K35) también se requieren para la unión a vWF A1 y a TNFR1 (Cedergren *et al.*, 1993; Gómez *et al.*, 2006; O'Seaghdha *et al.* 2006), mientras que los restos fundamentales para la interacción con V_H3 (Q26, G29, F30, S33, D36, D37, Q40, N43, E47) no tienen impacto alguno en las actividades de unión de Fc, vWF A1 o TNFR1 de la IgG (Jansson *et al.*, 1998; Graille *et al.*, 2000). La actividad de unión a Fab de la inmunoglobulina de la proteína A se dirige a un subconjunto de linfocitos B que expresan IgM relacionada con la familia VH3 en su superficie, es decir, estas moléculas funcionan como receptores de linfocitos B de tipo VH3 (Roben *et al.*, 1995). Tras la interacción con SpA, estos linfocitos B proliferan rápidamente y, a continuación, se destinan a la apoptosis, lo que conduce a una eliminación preferencial y prolongada de los linfocitos B de tipo innato (es decir, linfocitos B de la zona marginal y linfocitos B2 foliculares) (Goodyear y Silverman, 2003; Goodyear y Silverman, 2004). Es importante señalar que más del 40 % de los linfocitos B circulantes son la diana de la interacción de la proteína A, y la familia VH3 representa la mayor familia de receptores de linfocitos B humanos que confieren respuestas humorales protectoras contra los patógenos (Goodyear y Silverman 2003; Goodyear y Silverman 2004). Por lo tanto, la proteína A funciona de forma análoga hacia los superantígenos estafilocócicos (Roben *et al.*, 1995), a pesar de que esta última clase de moléculas, por ejemplo, SEB, TSST-1, TSST-2, forman complejos con el receptor de linfocitos T para estimular inadecuadamente las respuestas inmunes del hospedador, generando, de ese modo, rasgos de enfermedad característicos de las infecciones estafilocócicas (Roben *et al.*, 1995; Tiedemann *et al.*, 1995). Dichos hallazgos en conjunto documentan las contribuciones de la proteína A en cuanto al establecimiento de infecciones estafilocócicas y en la modulación de las respuestas inmunes del hospedador.

Variante no toxigénica de la Proteína A. Los inventores han desarrollado una variante no toxigénica de la proteína A estafilocócica y, con este reactivo en mano, se pusieron como objetivo por primera vez a medir la respuesta inmune de animales a la inmunización de la proteína A. Además, los inventores abordaron la cuestión de si la inmunización de animales con una variante no toxigénica de la proteína A podría generar respuestas inmunes que elevaran la inmunidad protectora contra la infección estafilocócica.

Para alterar las actividades de unión de Fc, vWF A1 y TNFR1 a la IgG de la proteína A, se modificaron los restos 9 y 10 de la glutamina (Q) [la numeración en el presente documento se obtiene a partir de la establecida para el dominio D de SpA] generando sustituciones de lisina o glicina para ambas glutaminas esperando que estas sustituciones suprimieran los enlaces de iones formados entre la proteína A de tipo silvestre y sus ligandos. El efecto añadido de las dobles sustituciones de lisina puede ser que estos restos con carga positiva instituyen una carga repelente para las inmunoglobulinas. Para alterar la unión de Fab VH3 a la IgM, los inventores seleccionaron los restos de aspartato (D) 36 y 37 de SpA-D, cada uno de los cuales se requiere para la asociación de la proteína A con el receptor de linfocitos B. Ambos D36 y D37 se sustituyeron con alanina. Las mutaciones Q9,10K y D36,37A se combinaron en la molécula recombinante SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} y se examinaron para determinar las propiedades de unión de la proteína A.

En resumen, la secuencia genómica de la proteína A (*spa*) de *Staphylococcus aureus* N315 se amplificó mediante PCR con los cebadores (GCTGCACATATGGCGCAACACGATGAAGCTCAAC [cebador 5'] (SEQ ID NO: 35) y AGTGGATCCTTATGCTTTGTTAGCATCTGC [cebador 3'] (SEQ ID NO: 36)), clonados en el vector pET15b (pYSJ1, codones 48-486) (Stranger-Jones, *et al.*, 2006), y el plásmido recombinante se transformó en *E. coli* BL21(DE3) (Studier *et al.*, 1990). El producto de la proteína A obtenido de pYSJ1 alberga los restos 36-265 de SpA fusionados al marcador His N-terminal (MGSSHHHHHSSGLVPRGS (SEQ ID NO: 37)). Después de la expresión inducible por IPTG, se purificó la SpA marcada con His6 N-terminal recombinante por cromatografía de afinidad sobre resina de Ni-NTA (Stranger-Jones *et al.*, 2006). El dominio D de SpA (SpA-D) se amplificó por PCR con un par de cebadores específicos (AACATATGTTCAACAAAGATCAACAAAGC [cebador 5'] (SEQ ID NO: 38) y AAGGATCCAGATTCGTTTAAATTTTATAGC [cebador 3'] (SEQ ID NO: 39)), subclonados en el vector pET15b (pHAN1, codones 212-261 de *spa*), y el plásmido recombinante se transformó en *E. coli* BL21(DE3) para expresar y purificar la proteína marcada con His6 N-terminal recombinante. Para generar mutaciones en la secuencia de codificación de SpA-D, se sintetizaron conjuntos de dos pares de cebadores (para las sustituciones de D a A: CTTTCATTCAAAGTCTTAAAGCGCCCAAGCCAAAGCACTAAC [cebador 5'] (SEQ ID NO: 40) y GTTAGTGCTTTGGCTTGGGGCGGCTTAAAGACTTTGAATGAAG [cebador 3'] (SEQ ID NO: 41); para las sustituciones de Q a K CATATGTTCAACAAAGATAAAAAAGCGCCTTCTATGAAATC [cebador 5'] (SEQ ID NO: 42) y GATTTTCATAGAAGGCGCTTTTATCTTTGTTGAACATATG [cebador 3'] (SEQ ID NO: 43); para las sustituciones de Q a G CATATGTTCAACAAAGATGGAGGAAGCGCCTTCTATGAAATC [cebador 5'] (SEQ ID NO: 44) y GATTTTCATAGAAGGCGCTTCTCCATCTTTGTTGAACATATG [cebador 3'] (SEQ ID NO: 45)). Los cebadores se usaron para protocolos de mutagénesis de cambios rápidos. A continuación de la mutagénesis, se confirmaron las secuencias de ADN para cada una de las proteínas recombinantes: SpA, SpA-D y SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} y SpA-D_{Q9,10K;D36,37A}. Todas las proteínas se purificaron a partir de lisados de *E. coli* recombinante usando cromatografía con Ni-NTA, y posteriormente se sometieron a diálisis contra PBS y se almacenaron a 4 °C.

Para medir la unión de la inmunoglobulina a la proteína A y a sus variantes, se diluyeron 200 µg de proteína purificada en un volumen de 1 ml usando un tampón de columna (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) y, a continuación, se cargó en una columna de Ni-NTA pre-equilibrada (1 ml de volumen del lecho). Las columnas se lavaron con 10 ml de tampón de columna. Se diluyeron 200 µg de IgG humana en un volumen total de tampón de columna de 1 ml y, a continuación, se aplicó a cada una de las columnas cargadas con proteína A y sus variantes. Las columnas se lavaron posteriormente con 5 ml de tampón de lavado (imidazol 10 mM en tampón de columna) y 5 ml de tampón de columna. Las muestras de proteínas se eluyeron con 2 ml de tampón de elución (imidazol 500 mM en tampón de columna), se recogieron las fracciones y los alícuotas se sometieron a electroforesis en gel SDS-PAGE, seguido de tinción con azul Coomassie. Como se muestra en la Figura 3, la proteína A de tipo silvestre (SpA) y su dominio D de SpA ambos mantuvieron la inmunoglobulina durante la cromatografía. Por el contrario, la variante de SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} no se unió a la inmunoglobulina.

Para cuantificar la unión de la proteína A y sus variantes a la parte Fc de la inmunoglobulina y el dominio VH3 de Fab, se usó inmunoglobulina G humana conjugada con HRP [hIgG], la parte Fc de la IgG humana [hFc] y la parte F(ab)₂ de la IgG humana [hF(ab)₂] además de ensayos ELISA para cuantificar la cantidad relativa de unión a la proteína A y sus variantes. Los datos de la Figura 4 demuestran la unión de SpA y SpA-D a hIgG y hFc, mientras que SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} y SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} mostraron únicamente actividades de unión secundarias. La SpA unió cantidades similares de hFc y hF(ab)₂, sin embargo la unión de SpA-D a hF(ab)₂ fue reducida en comparación con la SpA de longitud completa. Este resultado sugiere que la presencia de múltiples dominios de unión a IgG puede aumentar de forma cooperativa la capacidad de la proteína A para unirse al receptor de linfocitos B. En comparación con el reducido poder de unión de SpA-D por hF(ab)₂, de las dos variantes solo SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} mostró una reducción significativa en la capacidad para unirse al dominio VH3 de la inmunoglobulina. Para examinar los atributos toxigénicos de SpA-D y sus variantes, se inyectaron proteínas purificadas en ratones, que fueron sacrificados después de 4 horas para extraerles el bazo. Se homogenizó tejido de los órganos, se eliminó material capsular y se colorearon linfocitos B con anticuerpos CD19 fluorescentes. Tras el análisis de FACS para cuantificar

la abundancia de linfocitos B en tejido esplénico, se observó que la SpA causa una caída del 5 % en el recuento de linfocitos B en comparación con un control de simulación (PBS) (FIG. 5). Por el contrario, SpA_{DQ9,10K; D36,37A} no causó ninguna reducción en los recuentos de linfocitos B, lo que indica que la molécula mutante había perdido sus atributos toxigénicos de estimulación de la proliferación y muerte de los linfocitos B (Figura 5). En resumen, las sustituciones de aminoácidos en los restos Q9, Q10, D36 y D37 de SpA-D suprimieron la capacidad de los dominios de la proteína A para unirse a las inmunoglobulinas o ejercer funciones toxigénicas en tejidos humanos o animales.

Las variantes de la proteína A no toxigénicas generan la protección de la vacuna. Para ensayar si la proteína A y sus variantes pueden funcionar como antígenos de vacuna, se emulsionaron SpA, SpA-D, SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} y SpA-D_{Q9,10G;D36,37A} con adyuvante de Freund completo o incompleto, y se inmunizaron ratones BALB/c de 4 semanas el día 1 y el día 11 con 50 µg de proteína purificada. Se analizaron cohortes de animales (n = 5) para determinar las respuestas inmunes humores a la inmunización mediante sangrado de los animales antes (día 0) y después del programa de inmunización (día 21). La Tabla 5 indica que los ratones inmunizados generaron una modesta respuesta inmune humoral dirigida a la proteína A o a su módulo SpA-D, mientras que la cantidad de anticuerpo generado después de la inmunización con SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} o SpA-D_{Q9,10G;D36,37A} aumentó de cuatro a cinco veces. Después de la exposición intravenosa con 1×10^7 UFC de *S. aureus* Newman, los animales se sacrificaron el día 4, se extrajeron los riñones y bien se analizaron para determinar la carga estafilocócica (sembrando tejido homogenizado sobre placas de agar y enumerando las unidades formadoras de colonia, UFC) o realizando histopatología. Como era esperada, los ratones inmunizados de forma simulada (PBS) (n = 19) portaban $6,46 \log_{10}$ ($\pm 0,25$) UFC en el tejido renal, y las lesiones infecciosas se organizaron en $3,7 (\pm 1,2)$ abscesos por órgano (n = 10) (Tabla 5). La inmunización de los animales con SpA condujo a una reducción de $2,51 \log_{10}$ UFC en el día 5 ($p = 0,0003$) con $2,1 (\pm 1,2)$ abscesos por órgano. Los últimos datos indican que no hubo una reducción significativa en la formación de abscesos ($p = 0,35$). La inmunización con SpA-D generó resultados similares: una reducción de $2,03 \log_{10}$ UFC en el día 5 ($p = 0,0001$) con $1,5 (\pm 0,8)$ abscesos por órgano ($p = 0,15$). Por el contrario, la inmunización con SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} o SpA-D_{Q9,10G;D36,37A} creó un aumento de la protección, con una reducción de $3,07 \log_{10}$ y $3,03 \log_{10}$ UFC en el día 4, respectivamente (significancia estadística $p < 0,0001$ para ambas observaciones). Además, la inmunización tanto con SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} como con SpA-D_{Q9,10G;D36,37A} generó una protección significativa de la formación de abscesos estafilocócicos, ya que solamente se identificaron $0,5 (\pm 0,4)$ y $0,8 (\pm 0,5)$ lesiones infecciosas por órgano ($p = 0,02$ y $p = 0,04$). Por lo tanto, la inmunización con variantes de proteína A no toxigénicas genera un aumento de las respuestas inmunes humores para la proteína A y proporciona inmunidad protectora contra la exposición estafilocócica. Estos datos indican que la proteína A es un candidato ideal para una vacuna humana que prevenga una enfermedad por *S. aureus*.

Estos emocionantes resultados tienen varias implicaciones para el diseño de una vacuna humana. En primer lugar, la generación de mutaciones por sustitución que afectan a la capacidad de los dominios de unión a inmunoglobulina de la proteína A, ya sea sola o en combinación con dos o más dominios, puede generar variantes no toxigénicas adecuadas para el desarrollo de una vacuna. Parece probable que una combinación de dominios de unión a IgG mutantes que se asemeje mucho a la estructura de la proteína A, pueda generar incluso mejores respuestas humores, como se describe en el presente documento, para el dominio D de SpA solo. Además, un atributo probable de los anticuerpos específicos de la proteína A puede ser que la interacción de los sitios de unión del antígeno con la superficie microbiana puede neutralizar la capacidad de los estafilococos de capturar inmunoglobulinas a través de la parte Fc, o de estimular el receptor de linfocitos B a través de las actividades de unión de VH3.

Tabla 5. Variantes de Proteína A no toxigénicas como antígenos vacunales para prevenir la enfermedad por *S. aureus*

Antígeno	Carga bacteriana del riñón (n = número de ratones)		Título de IgG		Formación de abscesos en ratones (n = número de ratones)		
	^a log ₁₀ UFC/g	^b Reducción	^c Valor de p	dAbsceso superficial	Reducción	eHistopatología	^f Valor de p
Simulación	6,46 ± 0,25 (n = 19)	-	-	<100	-	3,7 ± 1,2 (n = 10)	-
SpA	3,95 ± 0,56 (n = 20)	2,51	0,0003	1.706 ± 370	32 %	2,1 ± 1,2 (n = 10)	0,35
SpA-D	4,43 ± 0,41 (n = 18)	2,03	0,0001	381 ± 27	25 %	1,5 ± 0,8 (n = 10)	0,15
SpA-D1	3,39 ± 0,50 (n = 19)	3,07	< 0,0001	5.600 ± 801	59 %	0,5 ± 0,4 (n = 10)	0,02
SpA-D2	3,43 ± 0,46 (n = 19)	3,03	< 0,0001	3.980 ± 676	57 %	0,8 ± 0,5 (n = 10)	0,04

^aMedias de la carga estaflilócica calculada como el log₁₀ de UFC/g en tejidos renales homogenizados 4 días después de la infección en cohortes de 18 a 20 ratones BALB/c. Se indica el error típico de las medias (±ETM).

^bLa significación estadística se calculó con la prueba t de Student y se registraron los valores de p; los valores de p < 0,05 se consideraron significativos.

^cReducción en la carga bacteriana calculada como log₁₀ de UFC/g.

^dLa formación de abscesos en tejidos renales cuatro días después de la infección es midió mediante inspección macroscópica (% positivo).

^eHistopatología de secciones delgadas de riñón teñidas con hematoxilina-eosina de diez animales; se registró el número de abscesos por riñón y se promedió para la obtención de la media final (±ETM).

^fLa significación estadística se calculó con la prueba t de Student y se registraron los valores de p; los valores de p < 0,05 se consideraron significativos. SpA-D1 y SpA-D2 representan SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} y SpA-D_{Q9,10G;D36,37A}, respectivamente.

Protección de la vacuna en abscesos murinos, infección letal murina y modelos de neumonía murinos. Se han establecido tres modelos de animales para el estudio de la enfermedad infecciosa por *S. aureus*. Estos modelos se usan en el presente documento para examinar el nivel de inmunidad protectora proporcionada a través de la generación de los anticuerpos específicos de la proteína A.

Abscesos murinos – se inmunizan ratones BALB/c (hembras de 24 días de vida, 8-10 ratones por grupo, Charles River Laboratories, Wilinington, MA) mediante inyección intramuscular en la pata trasera con proteína purificada (Chang *et al.*, 2003; Schneewind *et al.*, 1992). Se administra SpA, SpA-D o SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} purificada (50 µg de proteína) en los días 0 (emulsionada a 1:1 con adyuvante completo de Freund) y 11 (emulsionada a 1:1 con adyuvante incompleto de Freund). Se extraen muestras de sangre mediante sangrado retroorbital en los días 0, 11 y 20. Se examinan los sueros mediante ELISA para determinar los títulos de IgG para las actividades de unión específica de SpA-D y SpA-D_{Q9,10K;D36,37A}. Se exponen los animales inmunizados en el día 21 mediante inyección retroorbital de 100 µl de una suspensión de *S. aureus* Newman o *S. aureus* USA300 (1×10^7 ufc). Para ello, se diluyen cultivos de una noche de *S. aureus* Newman a 1:100 en caldos de soja triptica recién preparados y se cultivan durante 3 h a 37 °C. Los estafilococos se centrifugan, se lavan dos veces y se diluyen en PBS para producir A₆₀₀ de 0,4 (1×10^8 ufc por ml). Se verifican las diluciones de forma experimental mediante siembra en placas de agar y formación de colonias. Se anestesian los ratones por inyección intraperitoneal de 80-120 mg of ketamina y 3-6 mg de xilacina por kilogramo de peso corporal y se infectan mediante inyección retroorbital. El día 5 o 15 después de la exposición, se practica la eutanasia a los ratones mediante inhalación de CO₂ comprimido. Se extraen los riñones y se homogenizan en Triton X-100 al 1 %. Los alícuotas se diluyen y se siembran en placas sobre medio de agar para la determinación por triplicado de las ufc. Para la histología, se incuba el tejido renal a temperatura ambiente en formalina al 10 % durante 24 h. Se embeben los tejidos en parafina, se preparan en secciones finas, se tiñen con hematoxilina-eosina y se examinan mediante microscopía.

Infección letal murina – se inmunizan ratones BALB/c (hembras de 24 días de vida, 8-10 ratones por grupo, Charles River Laboratories, Wilinington, MA) mediante inyección intramuscular en la pata trasera con SpA, SpA-D o SpA-D_{Q9,10K; D36,37A} purificadas (50 µg de proteína). La vacuna se administra en los días 0 (emulsionada a 1:1 con adyuvante completo de Freund) y 11 (emulsionada a 1:1 con adyuvante incompleto de Freund). Se extraen muestras de sangre mediante sangrado retroorbital en los días 0, 11 y 20. Se examinan los sueros mediante ELISA para determinar los títulos de IgG para la actividad de unión específica de SpA-D y SpA-D_{Q9,10K;D36,37A}. Los animales inmunizados se exponen el día 21 mediante inyección retroorbital de 100 µl de una suspensión de *S. aureus* Newman o *S. aureus* USA300 (15×10^7 ufc) (34). Para ello, se diluyen cultivos de una noche de *S. aureus* Newman a 1:100 en caldo de soja triptica recién preparado y se cultivan durante 3 h a 37 °C. Los estafilococos se centrifugan, se lavan dos veces y se diluyen en PBS para producir de 0,4 (1×10^8 ufc por ml) y se concentran. Se verifican las diluciones de forma experimental mediante siembra en placas de agar y formación de colonias. Los ratones se anestesian por inyección intraperitoneal de 80-120 mg of ketamina y 3-6 mg de xilacina por kilogramo de peso corporal. Los animales inmunizados se someten a la exposición el día 21 mediante inyección intraperitoneal con 2×10^{10} ufc de *S. aureus* Newman de $3-10 \times 10^9$ ufc de aislados de *S. aureus* clínico. Los animales son controlados durante 14 días, y se registra la enfermedad letal.

Modelo de neumonía murino – Se cultivan cepas de *S. aureus* Newman o USA300 (LAC) a 37 °C en caldo de soja triptica/agar para OD₆₆₀ 0,5. Se centrifugan alícuotas de 50 ml del cultivo, se lavan en PBS y se suspenden en 750 µl de PBS para realizar estudios de mortalidad ($3-4 \times 10^8$ UFC por un volumen de 30 µl) o 1,250 µl de PBS (2×10^8 UFC por volumen de 30 µl) para experimentos de carga bacteriana e histopatología (2, 3). Para la infección pulmonar, se anestesian ratones C57BL/6J de 7 semanas de vida (The Jackson Laboratory) antes de la inoculación de 30 µl de suspensión de *S. aureus* en la fosa nasal izquierda. Se introducen los animales en la jaula en posición supina para su recuperación y se observan durante 14 días. Para la inmunización activa, ratones de 14 semanas de vida reciben 20 µg de SpA-D o SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} en CFA (adyuvante completo de Freund) en el día 0 por vía i.m., seguido de un refuerzo con 20 µg de SpA-D o SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} en adyuvante incompleto de Freund (IFA) en el día 10. Los animales se someten a la exposición con *S. aureus* en el día 21. Se recogen los sueros antes de la inmunización y en el día 20 para evaluar la producción de anticuerpos específicos. Para estudios de inmunización pasiva, ratones de 7 semanas de vida reciben 100 µl bien de NRS (suero normal de conejo) o de antisuero de conejo específico de SpA-D por inyección i.p. 24 h antes de la exposición. Para evaluar las correlaciones patológicas de la neumonía, los animales infectados se sacrifican mediante inhalación de CO₂ forzada antes de la extracción de ambos pulmones. Se homogeniza el pulmón derecho para la enumeración de la carga bacteriana pulmonar. Se dispone el pulmón izquierdo embebido en formalina al 1 % y parafina, se prepara en secciones finas, se tiñe con hematoxilina-eosina y se analiza mediante microscopía.

Anticuerpos de conejo – Se usan 200 µg de SpA-D o SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} purificadas como inmunógeno para la producción de antisuero de conejo. Se emulsionan 200 µg de proteína con CFA para su inyección el día 0, seguido de inyecciones de refuerzo con 200 µg de proteína emulsionada con IFA los días 21 y 42. Los títulos de anticuerpos de conejo se determinan mediante ELISA. Se obtienen anticuerpos purificados mediante cromatografía por afinidad de suero de conejo en SpA-D o SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} seferosa. Se mide la concentración de anticuerpos eluidos mediante absorbancia en A₂₈₀ y los títulos de anticuerpos específicos se determinan mediante ELISA.

Inmunización activa con variantes de dominio D de SpA – Para determinar la eficacia de la vacuna, los animales se inmunizan de forma activa con SpA-D o SpAD_{Q9,10K; D36,37A} purificada. Como control, los animales se inmunizan solo con adyuvante. Se determinan los títulos de anticuerpos contra los preparados de proteína A usando SpA-D o SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} como antígenos; cabe señalar que la variante de SpAD_{Q9,10K;D36,37A} no puede unirse a la parte Fc o Fab de la IgG. Usando los modelos de enfermedades infecciosas descritos anteriormente, se mide cualquier reducción en la carga bacteriana (abscesos murinos y neumonía), evidencia histopatológica de la enfermedad estafilocócica (abscesos murinos y neumonía) y protección de la enfermedad letal (exposición letal murina y neumonía).

Inmunización pasiva con anticuerpos policlonales de conejo purificados por afinidad generados contra las variantes de dominio D de SpA. Para determinar la inmunidad protectora de los anticuerpos de conejo específicos de la proteína A, los ratones se inmunizan de forma pasiva con 5 mg/kg de SpA-D o SpAD_{Q9,10K; D36,37A} purificada obtenida de anticuerpos de conejo. Ambos preparados de anticuerpos se purifican mediante cromatografía de afinidad usando SpA-D o SpA-D_{Q9,10K;D36,37A}. Como control, los animales se inmunizan de forma pasiva con anticuerpos rV10 (un antígeno de protección contra plagas que no tiene ningún impacto en el resultado de las infecciones estafilocócicas). Se determinan los títulos de anticuerpos contra todos los preparados de proteína A usando SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} como antígeno, y esta variante no puede unirse a la parte Fc o Fab de la IgG. Usando los modelos de enfermedades infecciosas descritos anteriormente, se mide la reducción en la carga bacteriana (abscesos murinos y neumonía), evidencia histopatológica de la enfermedad estafilocócica (abscesos murinos y neumonía) y la protección de la enfermedad letal (exposición letal murina y neumonía).

EJEMPLO 2

VACUNA DE PROTEÍNA A NO TOXIGÉNICA PARA LA INFECCIÓN POR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RESISTENTE A LA METICILINA

Los aislados clínicos de *S. aureus* expresan la proteína A (Shopsin *et al.*, 1999, cuyo producto de traducción primario se compone de un péptido señal N-terminal (DeDent *et al.*, 2008), cinco BD de Ig (denominados E, D, A, B y C) (Sjodahl, 1977), una región X con repeticiones variables de un péptido de ocho restos (Guss *et al.*, 1984), y una señal de clasificación C-terminal para el anclaje de la pared celular de SpA (Schneewind *et al.*, 1992; Schneewind *et al.*, 1995) (FIG. 6). Guiada por la homología de aminoácidos (Uhlen *et al.*, 1984), la estructura de haz de triple hélice α de los BD de Ig (Deisenhofer *et al.*, 1978; Deisenhofer *et al.*, 1981) y sus interacciones atómicas con Fab V_H3 (Graille *et al.*, 2000) o Fc γ (Gouda *et al.*, 1998), se seleccionó la glutamina 9 y la 10, además de aspartato 36 y 37 como fundamentales para la asociación de SpA con anticuerpos o receptor de linfocitos B, respectivamente. Se introdujeron sustituciones Gln9Lys, Gln10Lys, Asp36Ala y Asp37Ala en el dominio D para generar SPA-D_{KKAA} (FIG. 6). Se analizó la capacidad de la SpA-D o SpA-D_{KKAA} para unirse a la IgG humana mediante cromatografía de afinidad (FIG. 6). La SpA-D marcada con Polihistidina además de la SpA de longitud completa mantuvo la IgG humana en Ni-NTA, mientras que SPA-D_{KKAA} y un control negativo (SrtA) no (FIG. 6). Se observó un resultado similar con el factor de von Willebrand (Hartleib *et al.*, 2000), que, junto con el receptor del factor de necrosis tumoral 1 (TNFR1) (Gomez *et al.*, 2004), también puede unirse a la proteína A a través de la glutamina 9 y 10 (FIG. 6). La inmunoglobulina humana engloba un 60-70 % de IgG de tipo VH3. Los inventores distinguen entre el dominio Fc y la activación del receptor de linfocitos B de las Ig, y midieron la asociación de los fragmentos de Fc γ y F(ab)₂ humanos, uniéndose ambos a SpA o SpAD de longitud completa, pero no a SPA-D_{KKAA} (FIG. 6). La inyección de SpA-D en la cavidad peritoneal de los ratones produjo la expansión de linfocitos B seguida del colapso apoptótico de los linfocitos CD19+ en tejido del bazo de ratones BALB/c (Goodyear y Silverman, 2003) (FIG. 6). No se observó actividad de superantígenos de linfocitos B tras la inyección con SpA-D_{KKAA}, y la tinción de TUNEL de tejido esplénico no detectó el aumento en células apoptóticas que siguen a la inyección de SpA o SpA-D (FIG. 6).

Se inyectaron en ratones BALB/c de seis semanas de vida sin tratamiento previo 50 μ g de SpA, SpA-D o SpA-D_{KKAA} emulsionado en CFA y reforzado con el mismo antígeno emulsionado en IFA. De acuerdo con la hipótesis de que SpA-D potencia el colapso apoptótico de las poblaciones de linfocitos B clonales activados, los inventores observaron un título diez veces superior de anticuerpos específicos de SpA-D_{KKAA} después de la inmunización de ratones con la variante no toxigénica en comparación con el superantígeno de linfocitos B (SpA-D frente a SpA-D_{KKAA}; $p < 0,0001$, Tabla 6). Los títulos de anticuerpos generados por la inmunización con SpA de longitud completa fueron más elevados que los generados por la SpA-D ($p = 0,0022$), lo que, probablemente, se debe al mayor tamaño y estructura del dominio reiterativa de este antígeno (Tabla 6). No obstante, incluso la SpA provocó títulos de anticuerpos inferiores a SpA_{DKKAA} ($p = 0,0003$), lo que solo engloba 50 aminoácidos de la proteína A (520 restos, SEQ ID NO: 33). Los ratones inmunizados se sometieron a la exposición por inoculación intravenosa con *S. aureus* Newman y se examinó la capacidad de los estafilococos para diseminar abscesos en tejidos renales mediante necropsia cuatro días después de la exposición. En tejido renal homogenizado de ratones inmunizados mediante simulación (PBS/adyuvante), se enumeró una carga estafilocócica media de 6,46 log₁₀ UFC/g (Tabla 6). La inmunización de ratones con SpA o SpA-D condujo a la reducción de la carga estafilocócica; sin embargo, los animales vacunados con SpA-D_{KKAA} mostraron una reducción incluso mayor, de 3,07 log₁₀ UFC/g de *S. aureus* Newman en tejidos renales ($p < 0,0001$, Tabla 6). La formación de abscesos en riñones se analizó por histopatología (FIG. 7). Los animales inmunizados por simulación portan una media de 3,7 ($\pm 1,2$) abscesos por riñón (Tabla 6). La vacunación con SpA-D_{KKAA} redujo la cantidad media de abscesos a 0,5 ($\pm 0,4$) ($p = 0,0204$), mientras que la

inmunización con SpA o SpA-D no causó una reducción significativa en la cantidad de lesiones de abscesos (Tabla 6). Las lesiones de los animales vacunados con SpA-D_{KKAA} fueron de menor tamaño, con menos PMN infiltrantes y carecían, como característica, de comunidades de abscesos estafilocócicos (Cheng *et al.*, 2009) (FIG. 7). Los abscesos en los animales que habían sido inmunizados con SpA o SpA-D mostraron la misma estructura general de las lesiones en animales inmunizados por simulación (FIG. 7).

Los inventores examinaron si la inmunización con SpA-D_{KKAA} puede proteger a los ratones contra las cepas MRSA, y seleccionaron el aislado USA300 LAC para realizar la exposición en los animales (Diep *et al.*, 2006). Esta cepa CA-MRSA sumamente virulenta se propagó rápidamente por Estados Unidos, causando una importante morbilidad y mortalidad en seres humanos (Kennedy *et al.*, 2008). En comparación con los ratones de control con adyuvante, los animales inmunizados con SpA-D_{KKAA} portaron una reducción de la carga bacteriana de los tejidos renales infectados de $1,07 \log_{10}$ UFC/g. El examen histopatológico del tejido renal tras la exposición a *S. aureus* USA300 reveló que la cantidad media de abscesos se redujo de $4,04 (\pm 0,8)$ a $1,6 (\pm 0,6)$ ($p = 0,02774$). Por el contrario, la inmunización con SpA o SpA-D no causó una reducción significativa de la carga bacteriana ni la formación de abscesos (Tabla 6).

Se inmunizaron conejos con SpA-D_{KKAA} y los anticuerpos específicos se purificaron en columna de afinidad con SpA-D_{KKAA} seguido de SDS-PAGE (FIG. 8). Se escindió la IgG específica de SpA-D_{KKAA} con pepsina para generar fragmentos Fcy y F(ab)₂, purificándose estos últimos mediante cromatografía en columna de SpA-D_{KKAA} (FIG. 8). La unión de la IgG humana o vWF a SpA o SpA-D se vio alterada por F(ab)₂ específico de SpAD_{KKAA}, lo que indica que los anticuerpos obtenidos de SpA-D_{KKAA} neutralizan la función superantigénica de los linfocitos B de la proteína A, así como sus interacciones con Ig (FIG. 8).

Para mejorar aún más las propiedades de la vacuna para la proteína A no toxigénica, los inventores generaron SpA_{KKAA}, que incluye los cinco IgBD con cuatro sustituciones de aminoácidos – sustituciones que corresponden a Gln9Lys, Gln10Lys, Asp36Ala y Asp37Ala del dominio D – en cada uno de sus cinco dominios (E, D, A, B y C). Se purificó la SpA_{KKAA} marcada con polihistidina mediante cromatografía de afinidad y se analizó mediante SDS-PAGE con tinción con azul Coomassie (FIG. 9). Al contrario que la SpA de longitud completa, SpA_{KKAA} no se unió a la IgG humana, Fc y F(ab)₂ o a vWF (FIG. 9). La SpA_{KKAA} no mostró actividad superantigénica de los linfocitos B, ya que la inyección de la variante en los ratones BALB/c no causó un agotamiento de los linfocitos B CD19+ en tejido esplénico (FIG. 9). La vacunación con SpA_{KKAA} generó títulos de anticuerpos específicos más elevados que la inmunización con SpA-D_{KKAA} y proporcionó ratones con una elevada protección contra la exposición a *S. aureus* USA300 (Tabla 6). Cuatro días después de la exposición, los animales vacunados con SpA_{KKAA} portaban $3,54 \log_{10}$ de UFC/g menos estafilococos en tejidos renales ($p = 0,0001$) y también causó una reducción mayor en el número de lesiones de abscesos ($p = 0,0109$) (Tabla 6).

Se usó SpA_{KKAA} para inmunizar conejos. Los anticuerpos de conejo específicos de SpA-D_{KKAA} o SpA_{KKAA} se purificaron por afinidad en matrices con un antígeno afín inmovilizado e inyectado a una concentración de 5 mg/kg de peso corporal en la cavidad peritoneal de ratones BALB/c (Tabla 7). Veinticuatro horas después, se determinaron títulos de anticuerpos específicos en suero y se sometió a los animales a la exposición por inoculación intravenosa con *S. aureus* Newman. La transferencia pasiva redujo la carga estafilocócica en tejidos de riñón para anticuerpos específicos de SpA-D_{KKAA} ($p = 0,0016$) o SpA_{KKAA} ($p = 0,0005$). Al realizar el examen histopatológico, ambos anticuerpos redujeron la abundancia de lesiones de abscesos en los riñones de ratones expuestos a *S. aureus* Newman (Tabla 7). Estos datos en conjunto revelan que la protección de la vacuna tras la inmunización con SpA-D_{KKAA} o SpA_{KKAA} es conferida por los anticuerpos que neutralizan la proteína A.

Tabla 6. Inmunización de ratones con vacunas de proteína A

Antígeno	Carga estafilocócica de ratones con vacunas de vitamina A					
	^a $\log_{10}$ de UFC/g	^b Valor de p	^c Reducción ($\log_{10}$ de UFC/g)	^d Título de IgG	^e Número de abscesos	^b Valor de p
Exposición a <i>S. aureus</i> Newman						
Simulación	$6,46 \pm 0,25$	-	-	<100	$3,7 \pm 1,2$	-
SpA	$3,95 \pm 0,56$	0,0003	2,51	1706 ± 370	$2,1 \pm 1,2$	0,3581
SpA-D	$4,43 \pm 0,41$	0,0001	2,03	381 ± 27	$1,5 \pm 0,8$	0,1480
SpA-D _{KKAA}	$3,39 \pm 0,50$	<0,0001	3,07	5600 ± 801	$0,5 \pm 0,4$	0,0204
Exposición a <i>S. aureus</i> USA300 (LAC)						
Simulación	$7,20 \pm 0,24$	-	-	<100	$4,0 \pm 0,8$	-
SpA	$6,81 \pm 0,25$	0,2819	0,39	476 ± 60	$3,3 \pm 1,0$	0,5969
SpA-D	$6,34 \pm 0,52$	0,1249	0,86	350 ± 19	$2,2 \pm 0,6$	0,0912
SpA-D _{KKAA}	$6,00 \pm 0,42$	0,0189	1,20	3710 ± 1.147	$1,6 \pm 0,6$	0,0277
SpA _{KKAA}	$3,66 \pm 0,76$	0,0001	3,54	10200 ± 2.476	$1,2 \pm 0,5$	0,0109

Antígeno	Carga estafilocócica de ratones con vacunas de vitamina A					
	^a log ₁₀ de UFC/g	^b Valor de <i>p</i>	^c Reducción (log ₁₀ de UFC/g)	^d Título de IgG	^e Número de abscesos	^b Valor de <i>p</i>
^a Medias de la carga estafilocócica calculada como el log ₁₀ de UFC/g en tejidos renales homogenizados 4 días después de la infección en cohortes de quince a veinte ratones BALB/c por inmunización. Se muestra una representación de dos experimentos en animales independientes y reproducibles. Se indica el error típico de las medias (±ETM). ^b La significación estadística se calculó con la prueba t de Student de dos colas y se registraron los valores de <i>p</i> ; los valores de <i>p</i> < 0,05 se consideraron significativos. ^c Reducción en la carga bacteriana calculada como log ₁₀ de UFC/g. ^d Las medias de cinco títulos de IgG en suero seleccionados aleatoriamente se midieron previamente a la infección estafilocócica mediante ELISA. ^e Histopatología de secciones delgadas de riñón teñidas con hematoxilina-eosina de diez animales; se registró el número medio de abscesos por riñón y volvió a promediar para la obtención de la media final (±ETM).						

Tabla 7. Inmunización pasiva de ratones con anticuerpos contra la proteína A

^a Anticuerpo	Carga estafilocócica y formación de abscesos en tejido renal					
	^b log ₁₀ de UFC/g	^c Valor de <i>p</i>	^d Reducción (log ₁₀ de UFC/g)	^e Título de IgG	^f Número de abscesos	^c Valor de <i>p</i>
Simulación	7,10 ± 0,14	-	-	<100	4,5 ± 0,8	-
α-SpA _{KKAA}	5,53 ± 0,43	0,0016	1,57	466 ± 114	1,9 ± 0,7	0,0235
α-SpA _{KKAA}	5,69 ± 0,34	0,0005	1,41	1575 ± 152	1,6 ± 0,5	0,0062

^aSe inyectaron anticuerpos purificados por afinidad en la cavidad peritoneal de ratones BALB/c a una concentración de 5 mg/kg veinticuatro horas antes de la exposición a 1 x 10⁷ UFC de *S. aureus* Newman.

^bMedias de la carga estafilocócica calculada como el log₁₀ de UFC/g en tejidos renales homogenizados 4 días después de la infección en cohortes de quince ratones BALB/c por inmunización. Se muestra una representación de dos experimentos en animales independientes y reproducibles. Se indica el error típico de las medias (±ETM).

^cLa significación estadística se calculó con la prueba t de Student de dos colas desapareada y se registraron los valores de *p*; los valores de *p* < 0,05 se consideraron significativos.

^dReducción de la carga bacteriana calculada como log₁₀ de UFC/g.

^eLas medias de cinco títulos de IgG en suero seleccionados aleatoriamente se midieron previamente a la infección estafilocócica mediante ELISA.

^fHistopatología de secciones delgadas de riñón teñidas con hematoxilina-eosina de diez animales; se registró el número medio de abscesos por riñón y volvió a promediar para la obtención de la media final (±ETM).

- Tras la infección con *S. aureus* virulento, los ratones no desarrollan inmunidad protectora contra la posterior infección con la misma cepa (Burts *et al.*, 2008) (FIG. 10). La abundancia media de IgG específica de SpA-D_{KKAA} en estos animales se determinó mediante transferencia de puntos como 0,20 µg/ml (±0,04) y 0,14 µg/ml (±0,01) para cepas Newman y USA300 LAC, respectivamente (FIG. 9). Se calculó la concentración mínima de IgG específica de proteína A necesaria para la protección contra la enfermedad en animales vacunados con SpA_{KKAA} o SpA-D_{KKAA} (reducción de *p* = 0,05 log₁₀ en las UFC/g de tejido renal estafilocócico) como 4,05 µg/ml (±0,88). La concentración media en suero de IgG específica de SpA en voluntarios humanos adultos sanos (n = 16) fue de 0,21 µg/ml (±0,02). Por lo tanto, las infecciones por *S. aureus* en ratones o seres humanos no están asociadas con las respuestas inmunes que generan niveles significativos de anticuerpos neutralizantes dirigidos contra la proteína A, lo que es probable que se deba a las propiedades superantigénicas de los linfocitos B de esta molécula. Por el contrario, la concentración media en suero de IgG específica de la toxina de la difteria en voluntarios humanos, 0,068 µg/ml (±0,20), se situó dentro del intervalo para la inmunidad protectora contra la difteria (Behring, 1890; Lagergard *et al.*, 1992).

- Los aislados clínicos de *S. aureus* expresan la proteína A, un factor de virulencia esencial cuya actividad superantigénica de linfocitos B y propiedades evasivas hacia el aclaramiento opsonó-fagocítico son absolutamente necesarias para la formación de abscesos estafilocócicos (Palmqvist *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2009; Silverman y Goodyear, 2006). Por lo tanto, la proteína A puede considerarse una toxina, esencial para la patogénesis, cuyas propiedades moleculares deben ser neutralizadas para lograr inmunidad protectora. Mediante la generación de variantes no toxigénicas incapaces de unirse a las Ig a través de los dominios Fcγ o VH₃-Fab, los inventores miden en el presente documento por primera vez las respuestas inmunes neutralizantes de la proteína A como una correlación para la inmunidad protectora contra la infección por *S. aureus*. En contraste con muchas cepas sensibles a la metilicina, el aislado USA300 LAC de CA-MRSA es significativamente más virulento (Cheng *et al.*, 2009). Por ejemplo, la inmunización de los animales experimentales con la proteína de superficie IsdB (Kuklin *et al.*, 2006; Stranger-Jones *et al.*, 2006) genera anticuerpos que confieren protección contra *S. aureus* Newman (Stranger-Jones *et al.*, 2009), pero no contra la exposición a USA300.

Los métodos utilizados incluyen:

Cepas y crecimiento bacteriano. Se cultivaron las cepas de *Staphylococcus aureus* Newman y USA300 en caldo de soja triptica (TSB) a 37 °C. Las cepas de *Escherichia coli* DH5α y BL21 (DE3) se cultivaron en caldo Luria-Bertani (LB) con 100 µg/ml de ampicilina a 37 °C.

Anticuerpos de conejo. La secuencia de codificación para SpA se amplificó por PCR con dos cebadores, gctgcacatattggcgcaacacgatgaagctcaac (SEQ ID NO: 35) y agtggatccttatgcttgagctttgttagcatctgc (SEQ ID NO: 36) usando ADN molde de *S. aureus* Newman. SpA-D se amplificó por PCR con dos cebadores, aacatatgttcaacaagatcaacaagc (SEQ ID NO: 38) y aaggatccagattcgtttaatttttagc (SEQ ID NO: 39). La secuencia para SpA-D_{KKAA} se sometió a mutagénesis con dos conjuntos de cebadores catatgttcaacaagataaaaaagcgcttctatgaaatc (SEQ ID NO: 42) y gatttcatagaaggcgctttttatcttgtgaacatag (SEQ ID NO: 43) para Q9K, Q10K además de cttcattcaaagtctaaagccgccaagccaaagcactaac (SEQ ID NO: 40) y gttagtgccttgctggggcggttaagactttgaatgaag (SEQ ID NO: 41) para D36A,D37A. La secuencia de SpA_{KKAA} fue sintetizada por Integrated DNA Technologies, Inc. Los productos de la PCR se clonaron en pET-15b generando una proteína recombinante marcada con His6 N-terminal. Los plásmidos se transformaron en BL21(DE3). Los cultivos de una noche de los transformantes se diluyeron a 1:100 en medio recién preparado y se cultivaron a 37 °C hasta una DO₆₀₀ DE 0,5, punto en el que los cultivos se indujeron con isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM y se cultivaron durante tres horas más. Se sedimentaron las células bacterianas mediante centrifugación, se suspendieron en un tampón de columna (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM) y se rompieron con una prensa French a 14.000 psi. Se aclararon los lisados de la membrana y los componentes insolubles mediante ultracentrifugación a 40.000 xg. Se sometieron las proteínas del lisado soluble a cromatografía de afinidad con níquel-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA, Qiagen). Se eluyeron las proteínas en tampón de columna que contenía concentraciones sucesivamente más elevadas de imidazol (100-500 mM). Las concentraciones de proteínas se determinaron mediante ensayo del ácido bicinconínico (BCA) (Thermo Scientific). Para la generación de anticuerpos, se inmunizaron conejos (6 meses de vida, Nueva Zelanda blancos, hembras, Charles River Laboratories) con 500 µg de proteína emulsionada en adyuvante completo de Freund (Difco) mediante inyección subcapsular. Para las inmunizaciones de refuerzo, se emulsionaron las proteínas en Adyuvante incompleto de Freund y se inyectaron 24 o 48 días después de la inmunización inicial. El día 60, los conejos se desangraron y se recuperó el suero.

Se enlazó el antígeno purificado (5 mg de proteína) covalentemente a columnas HP de HiTrap activada por NHS (GE Healthcare). Se usó matriz de antígeno para la cromatografía de afinidad de 10-20 ml de suero de conejo a 4 °C. Se lavó la matriz cargada con 50 volúmenes de columna de PBS, se eluyeron los anticuerpos con un tampón de elución (glicina 1 M, pH 2,5, NaCl 0,5 M) y se neutralizó inmediatamente con Tris-HCl 1 M, pH 8,5. Se sometieron los anticuerpos purificados a diálisis durante toda la noche contra PBS a 4 °C.

Fragmentos F(ab)₂. Se mezclaron anticuerpos purificados por afinidad con 3 mg de pepsina a 37 °C durante 30 minutos. Se inactivó la reacción con Tris-HCl 1 M, pH 8,5 y se purificaron por afinidad fragmentos F(ab)₂ con columnas HP de HiTrap activadas por NHS conjugadas con antígenos específicos. Se sometieron los anticuerpos purificados a diálisis contra PBS a 4 °C, se cargaron en gel SDS-PAGE y se visualizaron con tinción de azul Coomassie.

Inmunización activa y pasiva. Se inmunizaron ratones BALB/c (de 3 semanas de vida, hembras, Charles River Laboratories) con 50 µg de proteína emulsionada en adyuvante de Freund completo (Difco) por inyección intramuscular. Para las inmunizaciones de refuerzo, se emulsionaron las proteínas en Adyuvante incompleto de Freund y se inyectaron 11 días después de la inmunización inicial. El día 20 después de la inmunización, se desangraron 5 ratones para determinar los títulos mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a una enzima (ELISA).

Los anticuerpos purificados por afinidad en PBS se inyectaron a una concentración de 5 mg/kg de peso del animal experimental en la cavidad peritoneal de ratones BALB/c (6 semanas de vida, hembras, Charles River Laboratories) 24 horas antes de la exposición a *S. aureus*. La sangre del animal se recogió por punción en la vena periorbital. Se extrajeron células sanguíneas con tubos capilares de microhematocrito heparinizados (Fisher), y se usaron microtubos de separación de suero Z-gel (Sarstedt) para recoger y medir los títulos de anticuerpos específicos del antígeno mediante ELISA.

Abscesos renales de ratón. Se diluyeron cultivos de una noche de *S. aureus* Newman o USA300 (LAC) a 1:100 en TSB recién preparado y se cultivaron durante 2 horas a 37 °C. Se sedimentaron los estafilococos, se lavaron y se suspendieron en PBS a DO₆₀₀ de 0,4 (~1 x 10⁸ UFC/ml). Los inóculos se cuantificaron extendiendo muestras de alícuotas en TSA y enumerando las colonias formadas. Se anestesiaron ratones BALB/c (de 6 semanas de vida, hembras, Charles River Laboratories) mediante inyección intraperitoneal con 100 mg/ml de ketamina y 20 mg/ml de xilacina por kilogramo de peso corporal. Los ratones se inyectaron mediante inyección retroorbital con 1 x 10⁷ UFC de *S. aureus* Newman o 5 x 10⁶ UFC de *S. aureus* USA300. El día 4 después de la exposición, los ratones fueron sacrificados mediante inhalación de CO₂. Se extrajeron ambos riñones, y se analizó la carga estafilocócica en un órgano homogenizando el tejido renal con PBS, Triton X-100 al 1 %. Se extendieron diluciones en serie del homogenizado en TSA y se incubaron para la formación de colonias. El órgano restante se examinó mediante

histopatología. En resumen, se fijaron los riñones en formalina al 10 % durante 24 horas a temperatura ambiente. Se embebieron los tejidos en parafina, se prepararon en secciones finas, se tiñeron con hematoxilina-eosina, y se examinaron por microscopía óptica para enumerar las lesiones de abscesos. Todos los experimentos con ratones se realizaron de acuerdo con las directrices institucionales, siguiendo el informe de protocolo experimental y la aprobación del Comité Institucional de Bioseguridad (IBC) y el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales (IACUC) de la Universidad de Chicago.

Unión de la proteína A. Para la unión a la IgG humana, se precargaron columnas de afinidad con Ni-NTA con 200 µg de proteínas purificadas (SpA, SpA-D, SpA-D_{KKAA} y SrtA) en tampón de columna. Después del lavado, se cargaron en la columna 200 µg de IgG humana (Sigma). Se recogieron las muestras de proteínas de los lavados y eluciones, y se sometieron a electroforesis en gel SDS-PAGE, seguido de tinción con azul Coomassie. Las proteínas purificadas (SpA, SpA_{KKAA}, SpA-D y SpA-D_{KKAA}) se recubrieron en placas de ELISA MaxiSorp (NUNC) en tampón de carbonato 0,1 M (pH 9,5) a una concentración de 1 µg/ml durante una noche a 4 °C. A continuación, se bloquearon las placas con leche entera al 5 % mediante incubación con diluciones en serie de fragmentos de IgG conjugada con peroxidasa, Fc o F(ab)₂ durante una hora. Las placas se lavaron y se revelaron usando reactivos de ELISA OptEIA (BD). Las reacciones se inactivaron con ácido fosfórico 1 M y se usaron lecturas de A₄₅₀ para calcular el título máximo medio y el porcentaje de unión.

Ensayos de unión al factor de von Willebrand (vWF). Se recubrieron proteínas purificadas (SpA, SpA^{KKAA}, SpA D y SpAD_{KKAA}) y se bloquearon como se ha descrito anteriormente. Las placas se incubaron con vWF humano a una concentración de 1 µg/ml durante dos horas, a continuación se lavaron y se bloquearon con IgG humana durante otra hora. Tras el lavado, las placas se incubaron con dilución en serie de anticuerpos conjugados con peroxidasa dirigida contra el vWF durante una hora. Las placas se lavaron y se revelaron usando reactivos de ELISA OptEIA (BD). Las reacciones se inactivaron con ácido fosfórico 1 M y se usaron lecturas de A₄₅₀ para calcular el porcentaje de unión y de título máximo medio. Para los ensayos de inhibición, se incubaron las placas con fragmentos de F(ab)₂ purificados, específicos de SpA-D_{KKAA} a una concentración de 10 µg/ml durante una hora antes de los ensayos de unión al ligando.

Apóptosis de esplenocitos. Se inyectaron proteínas purificadas por afinidad (150 µg de SpA, SpA-D, SpA_{KKAA} y SpA-D_{KKAA}) en la cavidad peritoneal de ratones BALB/c (6 semanas de vida, hembras, Charles River Laboratories). Cuatro horas después de la inyección, se mataron los animales por inhalación de CO₂. Se extirparon los bazo y homogenizaron. Se retiraron los restos celulares usando un colador celular, y se transfirieron las células suspendidas a tampón de lisis ACK (NH₄Cl 0,15 M, KHCO₃ 10 mM, EDTA 0,1 mM) para lisar glóbulos rojos. Los glóbulos blancos se sedimentaron por centrifugación, se suspendieron en PBS y se tiñeron con anticuerpo monoclonal anti-CD19 conjugado con R-PE diluido a 1:250 (Invitrogen) en hielo y a oscuras durante una hora. Se lavaron las células con FBS al 1 % y se fijaron con formalina al 4 % durante una noche a 4 °C. Al día siguiente, las células se diluyeron en PBS y se analizaron mediante citometría de flujo. El órgano restante se examinó para histopatología. En resumen, se fijaron los bazo en formalina al 10 % durante 24 horas a temperatura ambiente. Se embebieron los tejidos en parafina, se seccionaron en cortes delgados, se tiñeron con el kit de detección de apoptosis (Millipore) y se examinaron mediante microscopía óptica.

Cuantificación de anticuerpos. Se recogieron sueros de voluntarios humanos sanos o ratones BALB/c que habían sido infectados con *S. aureus* Newman o USA300 durante 30 días o que habían sido inmunizados con SpA-D_{KKAA}/SpA_{KKAA} como se ha descrito anteriormente. Se transfirieron IgG humana/de ratón (Jackson Immunology Laboratory), SpA_{KKAA} y CRM19-7 a una membrana de nitrocelulosa. Se bloquearon las membranas con leche entera al 5 %, seguido de incubación bien con suero humano o de ratón. Se usó IgG antihumana/de ratón purificada conjugada IRDye 700DX conjugada (Rockland) para cuantificar las intensidades de señal usando el sistema de formación de imágenes infrarrojas Odyssey™ (Li-cor). Los experimentos con sangre de voluntarios humanos incluyeron protocolos que fueron revisados, aprobados y realizados bajo la supervisión reguladora de la Junta de Revisión Institucional (IRB) de la Universidad de Chicago.

Análisis estadístico. Se realizaron pruebas t de Student de dos colas para analizar la significación estadística de los datos de abscesos renales, ELISA y superantígeno de linfocitos B.

Referencias

Patente de EE.UU. n.º 3.791.932
 Patente de EE.UU. n.º 3.949.064
 Patente de EE.UU. n.º 4.174.384
 Patente de EE.UU. n.º 4.338.298
 Patente de EE.UU. n.º 4.356.170
 Patente de EE.UU. n.º 4.367.110
 Patente de EE.UU. n.º 4.372.945
 Patente de EE.UU. n.º 4.452.901
 Patente de EE.UU. n.º 4.474.757
 Patente de EE.UU. n.º 4.554.101

	Patente de EE.UU. n.º 4.578.770
	Patente de EE.UU. n.º 4.596.792
	Patente de EE.UU. n.º 4.599.230
	Patente de EE.UU. n.º 4.599.231
5	Patente de EE.UU. n.º 4.601.903
	Patente de EE.UU. n.º 4.608.251
	Patente de EE.UU. n.º 4.683.195
	Patente de EE.UU. n.º 4.683.202
	Patente de EE.UU. n.º 4.684.611
10	Patente de EE.UU. n.º 4.690.915
	Patente de EE.UU. n.º 4.690.915
	Patente de EE.UU. n.º 4.748.018
	Patente de EE.UU. n.º 4.800.159
	Patente de EE.UU. n.º 4.879.236
15	Patente de EE.UU. n.º 4.952.500
	Patente de EE.UU. n.º 5.084.269
	Patente de EE.UU. n.º 5.199.942
	Patente de EE.UU. n.º 5.221.605
	Patente de EE.UU. n.º 5.238.808
20	Patente de EE.UU. n.º 5.302.523
	Patente de EE.UU. n.º 5.310.687
	Patente de EE.UU. n.º 5.322.783
	Patente de EE.UU. n.º 5.384.253
	Patente de EE.UU. n.º 5.464.765
25	Patente de EE.UU. n.º 5.512.282
	Patente de EE.UU. n.º 5.512.282
	Patente de EE.UU. n.º 5.538.877
	Patente de EE.UU. n.º 5.538.880
	Patente de EE.UU. n.º 5.548.066
30	Patente de EE.UU. n.º 5.550.318
	Patente de EE.UU. n.º 5.563.055
	Patente de EE.UU. n.º 5.580.859
	Patente de EE.UU. n.º 5.589.466
	Patente de EE.UU. n.º 5.591.616
35	Patente de EE.UU. n.º 5.610.042
	Patente de EE.UU. n.º 5.620.896
	Patente de EE.UU. n.º 5.648.240
	Patente de EE.UU. n.º 5.656.610
	Patente de EE.UU. n.º 5.702.932
40	Patente de EE.UU. n.º 5.736.524
	Patente de EE.UU. n.º 5.780.448
	Patente de EE.UU. n.º 5.789.215
	Patente de EE.UU. n.º 5.801.234
	Patente de EE.UU. n.º 5.840.846
45	Patente de EE.UU. n.º 5.843.650
	Patente de EE.UU. n.º 5.846.709
	Patente de EE.UU. n.º 5.846.783
	Patente de EE.UU. n.º 5.849.497
	Patente de EE.UU. n.º 5.849.546
50	Patente de EE.UU. n.º 5.849.547
	Patente de EE.UU. n.º 5.858.652
	Patente de EE.UU. n.º 5.866.366
	Patente de EE.UU. n.º 5.871.986
	Patente de EE.UU. n.º 5.916.776
55	Patente de EE.UU. n.º 5.922.574
	Patente de EE.UU. n.º 5.925.565
	Patente de EE.UU. n.º 5.925.565
	Patente de EE.UU. n.º 5.928.905
	Patente de EE.UU. n.º 5.928.906
60	Patente de EE.UU. n.º 5.932.451
	Patente de EE.UU. n.º 5.935.819
	Patente de EE.UU. n.º 5.935.825
	Patente de EE.UU. n.º 5.939.291
	Patente de EE.UU. n.º 5.942.391
65	Patente de EE.UU. n.º 5.945.100
	Patente de EE.UU. n.º 5.958.895

- Patente de EE.UU. n.º 5.981.274
 Patente de EE.UU. n.º 5.994.624
 Patente de EE.UU. n.º 6.00.8341
 Patente de EE.UU. n.º 6.288.214
 5 Patente de EE.UU. n.º 6.294.177
 Patente de EE.UU. n.º 6.651.655
 Patente de EE.UU. n.º 6.656.462
 Patente de EE.UU. n.º 6.733.754
 Patente de EE.UU. n.º 6.756.361
 10 Patente de EE.UU. n.º 6.770.278
 Patente de EE.UU. n.º 6.793.923
 Patente de EE.UU. n.º 6.814.971
 Patente de EE.UU. n.º 6.936.258
 Solicitud de patente de EE.UU. n.º 2002/0169288
 15 Solicitud de patente de EE.UU. n.º 2003/0153022
 Abdallah *et al.*, *Mol. Microbiol.*, 62, 667-679, 2006.
 Abdallah *et al.*, *Nat. Rev. Microbiol.*, 5, 883-891, 2007.
 Albus *et al.*, *Infect. Immun.*, 59:1008-1014, 1991.
 An, *J. Virol.*, 71(3):2292-302, 1997.
 20 Anavi, "Sc. thesis from the department of Molecular Microbiology and Biotechnology of the Tel-Aviv University", Israel, 1998.
 Andersen *et al.*, *J. Immunol.*, 154, 3359-3372, 1995.
 Angel *et al.*, *Cell*, 49:729, 1987b.
 Angel *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:2256, 1987a.
 25 Archer, *Clin. Infect. Dis.*, 26, 1179-1181, 1998.
 Atchison y Perry, *Cell*, 46:253, 1986.
 Atchison y Perry, *Cell*, 48:121, 1987.
 Ausubel *et al.*, In: Current Protocols in Molecular Biology, John, Wiley & Sons, Inc, Nueva York, 1996.
 Baba *et al.*, *J. Bacteriol.* 190:300-310, 2007.
 30 Bae y Schneewind, *Plasmid*, 55:58-63, 2006.
 Bae *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 101, 12312-12317, 2004.
 Banerji *et al.*, *Cell*, 27(2 Pt 1):299-308, 1981.
 Banerji *et al.*, *Cell*, 33(3):729-740, 1983.
 Barany y Merrifield, en: "The Peptides, Gross and Meienhofer" (Eds.), Academic Press, NY, 1-284, 1979.
 35 Behring EA. Über das Zustandekommen der Diphtherie - Immunität bei Thieren. Deutsche Medizinische Wochenschrift, 16:1145-8, 1890.
 Bellus, *J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem.*, A31(1): 1355-1376, 1994.
 Berkhout *et al.*, *Cell*, 59:273-282, 1989.
 Birch-Hirschfeld, L. 1934. Über die Agglutination von Staphylokokken durch Bestandteile des
 40 Säugetierblutplasmas.
 Klinische Wochenschrift 13:331.
 Bjerketorp *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 234:309-314, 2004.
 Blonar *et al.*, *EMBO J.*, 8:1139, 1989.
 Bodine y Ley, *EMBO J.*, 6:2997, 1987.
 45 Borrebaeck, en: "Antibody Engineering--A Practical Guide", W. H. Freeman and Co., 1992.
 Boshart *et al.*, *Cell*, 41:521, 1985.
 Bosze *et al.*, *EMBO J.*, 5(7):1615-1623, 1986.
 Boucher y Corey. *Clin. Infect. Dis.* 46:S334-S349, 2008.
 Braddock *et al.*, *Cell*, 58:269, 1989.
 50 Brown *et al.*, *Biochemistry*, 37:4397-4406, 1998.
 Bubeck Wardenburg y Schneewind. *J. Exp. Med.* 205:287-294, 2008.
 Bubeck-Wardenburg *et al.*, *Infect. Immun.* 74:1040-1044, 2007.
 Bubeck-Wardenburg *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 103:13831-13836, 2006.
 Bulla y Siddiqui, *J. Virol.*, 62:1437, 1986.
 55 Burke *et al.*, *J. Inf. Dis.*, 170:1110-1119, 1994.
 Burlak *et al.*, *Cell Microbiol.*, 9:1172-1190, 2007.
 Burts y Missiakas, *Mol. Microbiol.*, 69:736-46, 2008.
 Burts *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 102:1169-1174, 2005.
 Campbell y Villarreal, *Mol. Cell. Biol.*, 8:1993, 1988.
 60 Campere y Tilghman, *Genes and Dev.*, 3:537, 1989.
 Campo *et al.*, *Nature*, 303:77, 1983.
 Carbonelli *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 177(1):75-82, 1999.
 Cedergren *et al.*, *Protein Eng.*, 6:441-448, 1993.
 Celander y Haseltine, *J. Virology*, 61:269, 1987.
 65 Celander *et al.*, *J. Virology*, 62:1314, 1988.
 Cespedes *et al.*, *J. Infect. Dis.*, 191(3):444-52, 2005.

- Champion *et al.*, *Science*, 313:1632-1636, 2006.
 Chandler *et al.*, *Cell*, 33:489, 1983.
 Chandler *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 94(8):3596-601, 1997.
 Chang *et al.*, *Lancet.*, 362(9381):362-369, 2003.
 5 Chang *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:2153, 1989.
 Chatterjee *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 86:9114, 1989.
 Chen y Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7(8):2745-2752, 1987.
 Cheng *et al.*, *FASEB J.*, 23:1-12, 2009.
 Choi *et al.*, *Cell*, 53:519, 1988.
 10 Cocea, *Biotechniques*, 23(5):814-816, 1997.
 Cohen *et al.*, *J. Cell. Physiol.*, 5:75, 1987.
 Cosgrove *et al.*, *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 26:166-174, 2005.
 Costa *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:81, 1988.
 Cripe *et al.*, *EMBO J.*, 6:3745, 1987.
 15 Culotta y Hamer, *Mol. Cell. Biol.*, 9:1376, 1989.
 Dalbey y Wickner, *J. Biol. Chem.*, 260:15925-15931, 1985.
 Dandolo *et al.*, *J. Virology*, 47:55-64, 1983.
 De Villiers *et al.*, *Nature*, 312(5991):242-246, 1984.
 DeBord *et al.*, *Infect. Immun.*, 74:4910-4914, 2006.
 20 DeDent *et al.*, *EMBO J.* 27:2656-2668, 2008.
 DeDent *et al.*, *J. Bacteriol.* 189:4473-4484, 2007.
 Deisenhofer *et al.*, *Hoppe-Seyh Zeitsch. Physiol. Chem.* 359:975-985, 1978.
 Deisenhofer, *Biochemistry* 20:2361-2370, 1981.
 Deschamps *et al.*, *Science*, 230:1174-1177, 1985.
 25 Devereux *et al.*, *Nucl. Acid Res.*, 12:387-395, 1984.
 Diep *et al.*, *J. Infect. Dis.*, 193:1495-1503, 2006a.
 Diep *et al.*, *Lancet.*, 367:731-739, 2006b.
 Dinges *et al.*, *Clin. Microbiol. Rev.*, 13:16-34, 2000.
 Duthie y Lorenz, *J. Gen. Microbiol.*, 6:95-107, 1952.
 30 Edbrooke *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:1908, 1989.
 Edlund *et al.*, *Science*, 230:912-916, 1985.
 Ekstedt y Yotis, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 80:496-500, 1960.
 Emori y Gaynes, *Clin. Microbiol. Rev.*, 6:428-442, 1993.
 EP 0786519
 35 EP 497524
 EP 497525
 "Epitope Mapping Protocols", en: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Morris (Ed.), 1996.
 Fechheimer, *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 84:8463-8467, 1987.
 Feng y Holland, *Nature*, 334:6178, 1988.
 40 Field y Smith, *J. Comp. Pathol.*, 55:63, 1945.
 Firak y Subramanian, *Mol. Cell. Biol.*, 6:3667, 1986.
 Foecking y Hofstetter, *Gene*, 45(1):101-105, 1986.
 Fortune *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 102:10676-10681, 2005.
 Foster, *Nat. Rev. Microbiol.*, 3:948-958, 2005.
 45 Fournier *et al.*, *Infect. Immun.*, 45:87-93, 1984.
 Fraley *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 76:3348-3352, 1979.
 Friedrich *et al.*, *Nature*, 425:535-539, 2003.
 Fujita *et al.*, *Cell*, 49:357, 1987.
 Solicitud GB 2 202 328
 50 Gilles *et al.*, *Cell*, 33:717, 1983.
 Gloss *et al.*, *EMBO J.*, 6:3735, 1987.
 Godbout *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:1169, 1988.
 Gomez *et al.*, *EMBO J.* 26:701-709, 2007.
 Gomez *et al.*, *J. Biol. Chem.* 281:20190-20196, 2006.
 55 Gomez *et al.*, *Nature Med.* 10:842-8, 2004.
 Goodbourn y Maniatis, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 85:1447, 1988.
 Goodbourn *et al.*, *Cell*, 45:601, 1986.
 Goodyear y Silverman, *J. Exp. Med.*, 197:1125-1139, 2003.
 Goodyear y Silverman, *Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU.*, 101:111392-11397, 2004.
 60 Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985.
 Gouda *et al.*, *Biochemistry*, 31(40):9665-72, 1992.
 Gouda *et al.*, *Biochemistry*, 37:129-36, 1998.
 Graham y Van Der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973.
 Graille *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU.* 97:5399-5404, 2000.
 65 Greene *et al.*, *Immunology Today*, 10:272, 1989
 Grosschedl y Baltimore, *Cell*, 41:885, 1985.

- Guinn *et al.*, *Mol. Microbiol.*, 51:359-370, 2004.
 Guss *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 138:413-420, 1984.
 Harland y Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101(3):1094-1099, 1985.
 Harlow *et al.*, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.,
 5 Capítulo 8, 1988.
 Hartleib *et al.*, *Blood* 96:2149-2156, 2000.
 Harvey *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 83:1084-1088, 1986.
 Haslinger y Karin, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 82:8572, 1985.
 Hauber y Cullen, *J. Virology*, 62:673, 1988.
 10 Hen *et al.*, *Nature*, 321:249, 1986.
 Hensel *et al.*, *Lymphokine Res.*, 8:347, 1989.
 Herr y Clarke, *Cell*, 45:461, 1986.
 Hirochika *et al.*, *J. Virol.*, 61:2599, 1987.
 Hirsch *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:1959, 1990.
 15 Holbrook *et al.*, *Virology*, 157:211, 1987.
 Horlick y Benfield, *Mol. Cell. Biol.*, 9:2396, 1989.
 Hsu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 100:12420-12425, 2003.
 Huang *et al.*, *Cell*, 27:245, 1981.
 Hug *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:3065, 1988.
 20 Huston *et al.*, en: *Methods in Enzymology*, Langone (Ed.), Academic Press, NY, 203:46-88, 1991.
 Hwang *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:585, 1990.
 Imagawa *et al.*, *Cell*, 51:251, 1987.
 Imbra y Karin, *Nature*, 323:555, 1986.
 Imler *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:2558, 1987.
 25 Imperiale y Nevins, *Mol. Cell. Biol.*, 4:875, 1984.
 Innis *et al.*, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 85(24):9436-9440, 1988.
 Inouye y Inouye, *Nucleic Acids Res.*, 13: 3101-3109, 1985.
 Jakobovits *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:2555, 1988.
 Jameel y Siddiqui, *Mol. Cell. Biol.*, 6:710, 1986.
 30 Jansson *et al.*, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 20:69-78 1998.
 Jaynes *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:62, 1988.
 Jensen, *Acta Path. Microbiol. Scand.* 44:421-428, 1958.
 Johnson *et al.*, *Methods in Enzymol.*, 203:88-99, 1991.
 Johnson *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:3393, 1989.
 35 Jones, *Carb. Research*, 340:1097-1106, 2005.
 Jonsson *et al.*, *Oral Dis.*, 8(3):130-140, 2002.
 Joyce *et al.*, *Carbohydrate Research* 338:903-922 (2003
 Kadesch y Berg, *Mol. Cell. Biol.*, 6:2593, 1986.
 Kaeppler *et al.*, *Plant Cell Rep.*, 8:415-418, 1990.
 40 Kaneda *et al.*, *Science*, 243:375-378, 1989.
 Karin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:606, 1987.
 Katinka *et al.*, *Cell*, 20:393, 1980.
 Kato *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991.
 Kawamoto *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:267, 1988.
 45 Kennedy *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 105:1327-1332, 2008.
 Kiledjian *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:145, 1988.
 Kinoshita, M., N. Kobayashi, S. Nagashima, M. Ishino, S. Otokozawa, K. Mise, A. Sumi, H. Tsutsumi, N. Uehara,
 N. Watanabe y M. Endo. 2008. "Diversity of staphylocoagulase and identification of novel variants of
 staphylocoagulase gene in *Staphylococcus aureus*". *Microbiol. Immunol.*s 52:334-348.
 50 Klamut *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:193, 1990.
 Klevens *et al.*, *Clin. Infect. Dis.*, 2008; 47:927-30, 2008.
 Klevens *et al.*, *JAMA*, 298:1763-1771, 2007.
 Koch *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:303, 1989.
 Kohler y Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975
 55 Kriegler y Botchan, en: *Eukaryotic Viral Vectors*, Gluzman (Ed.), Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor
 Laboratory, NY, 1982.
 Kriegler y Botchan, *Mol. Cell. Biol.*, 3:325, 1983.
 Kriegler *et al.*, *Cell*, 38:483, 1984a.
 Kriegler *et al.*, *Cell*, 53:45, 1988.
 60 Kriegler *et al.*, en: "Cancer Cells 2/Oncogenes and Viral Genes", Van de Woude *et al.* eds, Cold Spring Harbor,
 Cold Spring Harbor Laboratory, 1984b.
 Kroh *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 106:7786-7791, 2009.
 Kuhl *et al.*, *Cell*, 50:1057, 1987.
 Kuklin *et al.*, *Infect. Immun.*, 74:2215-23, 2006.
 65 Kunz *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 17:1121, 1989.
 Kuroda *et al.*, *Lancet.*, 357:1225-1240, 2001.

- Kyte y Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157(1):105-132, 1982.
 Lagergard *et al.*, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 11:341-5, 1992.
 Lam *et al.*, *J. Bacteriol.*, 86:87-91, 1963.
 Larsen *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 83:8283, 1986, 1963.
 5 Laspia *et al.*, *Cell*, 59:283, 1989.
 Latimer *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:760, 1990.
 Lee *et al.*, *Nature*, 294:228, 1981.
 Lee *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 12:4191-206, 1984.
 Lee, *Trends Microbiol.* 4(4):162-166, 1996.
 10 Levenson *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 9(8):1233-1236, 1998.
 Levinson *et al.*, *Nature*, 295:79, 1982.
 Lin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:850, 1990.
 Lowy, *New Engl. J. Med.*, 339:520-532, 1998.
 Luria *et al.*, *EMBO J.*, 6:3307, 1987.
 15 Lusky y Botchan, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 83:3609, 1986.
 Lusky *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 3:1108, 1983.
 Macejak y Sarnow, *Nature*, 353:90-94, 1991.
 MacGurn *et al.*, *Mol. Microbiol.*, 57:1653-1663, 2005.
 Maira-Litran *et al.*, *Infect. Immun.*, 70:4433-4440, 2002.
 20 Maira-Litran *et al.*, *Vaccine*, 22:872-879, 2004.
 Majors y Varmus, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 80:5866, 1983.
 Markwardt, Untersuchungen über Hirudin. Naturwissenschaften, 41:537-538, 1955.
 Mazmanian *et al.*, *Mol. Microbiol.* 40, 1049-1057, 2001.
 Mazmanian *et al.*, *Mol. Microbiol.*, 40(5):1049-1057, 2001.
 25 Mazmanian *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 97:5510-5515, 2000.
 Mazmanian *et al.*, *Science*, 285(5428):760-3, 1999.
 McLaughlin *et al.*, *PLoS Pathog.*, 3:e105, 2007.
 McNeall *et al.*, *Gene*, 76:81, 1989.
 Mernaugh *et al.*, en: "Molecular Methods in Plant Pathology", Singh *et al.* (Eds.), CRC Press Inc., Boca Raton, FL,
 30 359-365, 1995.
 Merrifield, *Science*, 232(4748):341-347, 1986.
 Miksicek *et al.*, *Cell*, 46:203, 1986.
 Mordacq y Linzer, *Genes and Dev.*, 3:760, 1989.
 Moreau *et al.*, *Carbohydrate Res.*, 201:285-297, 1990.
 35 Moreau *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 9:6047, 1981.
 Moreillon *et al.*, *Infect. Immun.*, 63:4738-4743, 1995.
 Moreillon *et al.*, *Infect. Immun.*, 63:4738-4743, 1995.
 Mosmann y Coffman, *Ann. Rev. Immunol.*, 7:145-173, 1989.
 Muesing *et al.*, *Cell*, 48:691, 1987.
 40 Musher *et al.*, *Medicine (Baltimore)*, 73:186-208, 1994.
 Navarre y Schneewind, *J. Biol. Chem.*, 274:15847-15856, 1999.
 Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443, 1970.
 Ng *et al.*, *Nuc. Acids Res.*, 17:601, 1989.
 Nicolau y Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.
 45 Nicolau *et al.*, *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987.
 Novick, *Mol. Microbiol.*, 48:1429-1449, 2003.
 O'Brien *et al.*, *Mol. Microbiol.* 44:1033-1044, 2002.
 O'Seaghdha *et al.*, *FEBS J.* 273:4831-4841, 2006.
 Omirulleh *et al.*, *PlantMol. Biol.*, 21(3):415-28, 1993.
 50 Ondek *et al.*, *EMBO J.*, 6:1017, 1987.
 Ornitz *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:3466, 1987.
 Pallen, *Trends Microbiol.*, 10:209-212, 2002.
 Palmiter *et al.*, *Nature*, 300:611, 1982.
 Palmqvist *et al.*, *Microbes. Infect.*, 7:1501-11, 2005.
 55 Panizzi *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 281:1179-1187, 2006.
 Solicitud PCT PCT/US89/01025
 Solicitud PCT WO 00/02523
 Solicitud PCT WO 00/12132
 Solicitud PCT WO 00/12689
 60 Solicitud PCT WO 00/15238
 Solicitud PCT WO 01/34809
 Solicitud PCT WO 01/60852
 Solicitud PCT WO 01/98499
 Solicitud PCT WO 02/059148
 65 Solicitud PCT WO 02/094868
 Solicitud PCT WO 03/53462

- Solicitud PCT WO 04/43407
 Solicitud PCT WO 06/032472
 Solicitud PCT WO 06/032475
 Solicitud PCT WO 06/032500
 5 Solicitud PCT WO 07/113222
 Solicitud PCT WO 07/113223
 Solicitud PCT WO 94/09699
 Solicitud PCT WO 95/06128
 Solicitud PCT WO 95/08348
 10 Solicitud PCT WO 98/57994
 Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 85:2444, 1988.
 Pech *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:396, 1989.
 Pelletier y Sonenberg, *Nature*, 334(6180):320-325, 1988.
 Perez-Stable y Constantini, *Mol. Cell. Biol.*, 10:1116, 1990.
 15 Phonimdaeng *et al.*, *Mol. Microbiol.*, 4:393-404, 1990.
 Picard y Schaffner, *Nature*, 307:83, 1984.
 Pinkert *et al.*, *Genes and Dev.*, 1:268, 1987.
 Ponta *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 82:1020, 1985.
 Porton *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:1076, 1990.
 20 Potrykus *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 199(2):169-177, 1985.
 Pugsley, *Microbiol. Rev.*, 57:50-108, 1993.
 Pym *et al.*, *Mol. Microbiol.*, 46:709-717, 2002.
 Pym *et al.*, *Nat. Med.*, 9:533-539, 2003.
 Queen y Baltimore, *Cell*, 35:741, 1983.
 25 Quinn *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:4713, 1989.
 Redondo *et al.*, *Science*, 247:1225, 1990.
 Reisman y Rotter, *Mol. Cell. Biol.*, 9:3571, 1989.
 "Remington's Pharmaceutical Sciences", 18^a Ed. Mack Printing Company, 1289-1329, 1990.
 Resendez Jr. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:4579, 1988.
 30 Ripe *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:2224, 1989.
 Rippe, *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.
 Rittling *et al.*, *Nuc. Acids Res.*, 17:1619, 1989.
 Roben *et al.*, *J. Immunol.* 154:6437-6445, 1995.
 Rosen *et al.*, *Cell*, 41:813, 1988.
 35 Sakai *et al.*, *Genes and Dev.*, 2:1144, 1988.
 Salid-Salim *et al.*, *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 24:451-455, 2003.
 Sambrook *et al.*, en: "Molecular cloning", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001.
 Schaffner *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 201:81, 1988.
 Schneewind *et al.*, *Cell* 70:267-281, 1992.
 40 Schneewind *et al.*, *EMBO*, 12:4803-4811, 1993.
 Schneewind *et al.*, *Science*, 268:103-6, 1995.
 Searle *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 5:1480, 1985.
 Sharp y Marciniak, *Cell*, 59:229, 1989.
 Shaul y Ben-Levy, *EMBO J.*, 6:1913, 1987.
 45 Shaw *et al.*, *Microbiology*, 150:217-228, 2004.
 Sheagren, *N. Engl. J. Med.* 310:1368-1373, 1984.
 Sherman *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:50, 1989.
 Shopsin *et al.*, *J. Clin. Microbiol.*, 37:3556-63, 1999.
 Sibbald *et al.*, *Microbiol. Mol Biol. Rev.*, 70:755-788, 2006.
 50 Silverman y Goodyear. *Nat. Rev. Immunol.*, 6:465-75, 2006.
 Sjodahl, *Eur. J. Biochem.* 73:343-351, 1977.
 Sjoquist *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 30:190-194, 1972.
 Sleight y Lockett, *J. EMBO*, 4:3831, 1985.
 Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2:482, 1981.
 55 Smith *et al.*, *Brit. J. Exp. Pathol.*, 28:57, 1947.
 Sorensen *et al.*, *Infect. Immun.*, 63:1710-1717, 1995.
 Spalholz *et al.*, *Cell*, 42:183, 1985.
 Spandau y Lee, *J. Virology*, 62:427, 1988.
 Spandidos y Wilkie, *EMBO J.*, 2:1193, 1983.
 60 Stanley *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 100:13001-13006, 2003.
 Stephens y Hentschel, *Biochem. J.*, 248:1, 1987.
 Stewart y Young, en: "Solid Phase Peptide Synthesis", 2^a ed., Pierce Chemical Co., 1984.
 Stranger-Jones *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU.*, 103:16942-16947, 2006.
 Stuart *et al.*, *Nature*, 317:828, 1985.
 65 Studier *et al.*, *Methods Enzymol.* 185:60-89 1990.
 Sullivan y Peterlin, *Mol. Cell. Biol.*, 7:3315, 1987.

- Swartzendruber y Lehman, *J. Cell. Physiology*, 85:179, 1975.
 Takebe *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:466, 1988.
 Tam *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 105:6442, 1983.
 Tavernier *et al.*, *Nature*, 301:634, 1983.
 5 Taylor y Kingston, *Mol. Cell. Biol.*, 10:165, 1990a.
 Taylor y Kingston, *Mol. Cell. Biol.*, 10:176, 1990b.
 Taylor *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264:15160, 1989.
 Thiesen *et al.*, *J. Virology*, 62:614, 1988.
 Thomson *et al.*, *J. Immunol.*, 157(2):822-826, 1996.
 10 Tigges *et al.*, *J. Immunol.*, 156(10):3901-3910, 1996.
 Tigges *et al.*, *J. Immunol.*, 156(10):3901-3910, 1996.
 Ton-That *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 96(22):12424-9, 1999.
 Treisman, *Cell*, 42:889, 1985.
 Tronche *et al.*, *Mol. Biol. Med.*, 7:173, 1990.
 15 Trudel y Constantini, *Genes and Dev.*, 6:954, 1987.
 Tyndell *et al.*, *Nuc. Acids. Res.*, 9:6231, 1981.
 Uhlen *et al.*, *J. Biol. Chem.* 259:1695-1702 y 13628 (Corr.) 1984.
 van den Ent y Lowe, *FEBS Lett.*, 579:3837-3841, 2005.
 van Wely *et al.*, *FEMS Microbiol. Rev.*, 25:437-454, 2001.
 20 Vannice y Levinson, *J. Virology*, 62:1305, 1988.
 Vasseur *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 77:1068, 1980.
 Vaughan, *et al.*, *Nat. Biotech.* 16; 535-539, 1998.
 Wang y Calame, *Cell*, 47:241, 1986.
 Weber *et al.*, *Cell*, 36:983, 1984.
 25 Weinberger *et al. Mol. Cell. Biol.*, 8:988, 1984.
 Weiss *et al.*, *J. Antimicrob. Chemother.*, 53(3):480-6, 2004.
 Winoto y Baltimore, *Cell*, 59:649, 1989.
 Wong *et al.*, *Gene*, 10:87-94, 1980.
 Xu *et al.*, *J. Infect. Dis.*, 189:2323-2333, 2004.
 30 Xu *et al.*, *Mol. Microbiol.*, 66(3):787-800, 2007.
 Yutzey *et al. Mol. Cell. Biol.*, 9:1397, 1989.

Listado de secuencias

- 35 <110> SCHNEEWIND, OLAF
 CHENG, ALICE G.
 MISSIAKAS, DOMINIQUE
 KIM, HWAN
- 40 <120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS RELACIONADOS CON VARIANTES DE LA PROTEÍNA A (SpA)
 <130> ARCD.P0482WO2
- 45 <140> DESCONOCIDO
 <141> 01-07-2011
 <150> 61/361,218
 <151> 02-07-2010
- 50 <150> 61/370,725
 <151> 04-08-2010
 <160> 64
- 55 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 150
 <212> ADN
- 60 <213> *Staphylococcus sp.*
 <400> 1

ES 2 655 701 T3

ttcaacaaag atcaacaaag cgccttctat gaaatcttga acatgcctaa cttaaacgaa 60
 gcgcaacgta acggcttcat tcaaagtctt aaagacgacc caagccaaag cactaatgtt 120
 ttaggtgaag ctaaaaaatt aaacgaatct 150

<210> 2
 <211> 54
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus sp.*
 <400> 2

Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile
 1 5 10 15
 Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln
 20 25 30
 Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu Gly Glu Ala
 35 40 45
 Lys Lys Leu Asn Glu Ser
 50

<210> 3
 <211> 51
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus sp.*
 <400> 3

Gln His Asp Glu Ala Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Gln Val Leu Asn Met
 1 5 10 15
 Pro Asn Leu Asn Ala Asp Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys
 20 25 30
 Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Val Leu Gly Glu Ala Gln Lys Leu
 35 40 45
 Asn Asp Ser
 50

<210> 4
 <211> 52
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus sp.*
 <400> 4

ES 2 655 701 T3

Asn Asn Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn
1 5 10 15

Met Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu
20 25 30

Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ser Glu Ala Lys Lys
35 40 45

Leu Asn Glu Ser
50

<210> 5
<211> 52
<212> PRT
<213> *Staphylococcus* sp.

<400> 5

Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His
1 5 10 15

Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu
20 25 30

Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys
35 40 45

Leu Asn Asp Ala

<210> 6
<211> 52
<212> PRT
<213> *Staphylococcus* sp.

<400> 6

Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His
1 5 10 15

Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu
20 25 30

Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys
35 40 45

Leu Asn Asp Ala
50

<210> 7
<211> 52

<212> PRT
<213> *Staphylococcus sp.*

<220>
<221> misc_feature
<222> (7).(8)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
<221> misc_feature
<222> (34).(35)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 7

```

Asn Asn Phe Asn Lys Asp Xaa Xaa Ser Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn
1          5          10          15

Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu
          20          25          30

Lys Xaa Xaa Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu Gly Glu Ala Lys Lys
          35          40          45

Leu Asn Glu Ser
          50

```

<210> 8
<211> 52
<212> PRT
<213> *Staphylococcus sp.*

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7).(8)
<223> donde X es cualquier aminoácido distinto de Q

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12).(35)
<223> donde Y es cualquier aminoácido distinto de D

<400> 8

```

Asn Asn Phe Asn Lys Asp Xaa Xaa Ser Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn
1          5          10          15

Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu
          20          25          30

Lys Tyr Tyr Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu Gly Glu Ala Lys Lys
          35          40          45

Leu Asn Glu Ser
          50

```

ES 2 655 701 T3

<210> 9
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus* sp.

5

<400> 9

```

Met Lys Lys Lys Asn Ile Tyr Ser Ile Arg Lys Leu Gly Val Gly Ile
 1           5           10           15

Ala Ser Val Thr Leu Gly Thr Leu Leu Ile Ser Gly Gly Val Thr Pro
      20           25           30

Ala Ala Asn Ala Ala Gln His Asp Glu Ala Gln Gln Asn Ala Phe Tyr
      35           40           45

Gln Val Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Ala Asp Gln Arg Asn Gly Phe
      50           55           60

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Val Leu Gly
65           70           75           80

Glu Ala Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys Ala Asp Ala Gln
      85           90           95

Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile Leu

```

ES 2 655 701 T3

100								105				110				
Asn	Met	Pro	Asn	Leu	Asn	Glu	Ala	Gln	Arg	Asn	Gly	Phe	Ile	Gln	Ser	
		115					120					125				
Leu	Lys	Asp	Asp	Pro	Ser	Gln	Ser	Thr	Asn	Val	Leu	Gly	Glu	Ala	Lys	
	130					135					140					
Lys	Leu	Asn	Glu	Ser	Gln	Ala	Pro	Lys	Ala	Asp	Asn	Asn	Phe	Asn	Lys	
145					150					155					160	
Glu	Gln	Gln	Asn	Ala	Phe	Tyr	Glu	Ile	Leu	Asn	Met	Pro	Asn	Leu	Asn	
				165					170					175		
Glu	Glu	Gln	Arg	Asn	Gly	Phe	Ile	Gln	Ser	Leu	Lys	Asp	Asp	Pro	Ser	
			180					185					190			
Gln	Ser	Ala	Asn	Leu	Leu	Ser	Glu	Ala	Lys	Lys	Leu	Asn	Glu	Ser	Gln	
		195					200					205				
Ala	Pro	Lys	Ala	Asp	Asn	Lys	Phe	Asn	Lys	Glu	Gln	Gln	Asn	Ala	Phe	
	210					215					220					
Tyr	Glu	Ile	Leu	His	Leu	Pro	Asn	Leu	Asn	Glu	Glu	Gln	Arg	Asn	Gly	
225					230					235					240	
Phe	Ile	Gln	Ser	Leu	Lys	Asp	Asp	Pro	Ser	Val	Ser	Lys	Glu	Ile	Leu	
				245					250					255		
Ala	Glu	Ala	Lys	Lys	Leu	Asn	Asp	Ala	Gln	Ala	Pro	Lys	Glu	Glu	Asp	
			260					265					270			
Asn	Lys	Lys	Pro	Gly	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	Lys	Pro	Gly	Lys	Glu	Asp	
		275					280					285				
Gly	Asn	Lys	Pro	Gly	Lys	Glu	Asp	Asn	Lys	Lys	Pro	Gly	Lys	Glu	Asp	
	290					295					300					
Gly	Asn	Lys	Pro	Gly	Lys	Glu	Asp	Asn	Asn	Lys	Pro	Gly	Lys	Glu	Asp	
305					310					315					320	
Gly	Asn	Lys	Pro	Gly	Lys	Glu	Asp	Asn	Asn	Lys	Pro	Gly	Lys	Glu	Asp	
				325					330					335		
Gly	Asn	Lys	Pro	Gly	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	Lys	Pro	Gly	Lys	Glu	Asp	
			340					345					350			

ES 2 655 701 T3

Gly Asn Gly Val His Val Val Lys Pro Gly Asp Thr Val Asn Asp Ile
355 360 365

Ala Lys Ala Asn Gly Thr Thr Ala Asp Lys Ile Ala Ala Asp Asn Lys
370 375 380

Leu Ala Asp Lys Asn Met Ile Lys Pro Gly Gln Glu Leu Val Val Asp
385 390 395 400

Lys Lys Gln Pro Ala Asn His Ala Asp Ala Asn Lys Ala Gln Ala Leu
405 410 415

Pro Glu Thr Gly Glu Glu Asn Pro Phe Ile Gly Thr Thr Val Phe Gly
420 425 430

Gly Leu Ser Leu Ala Leu Gly Ala Ala Leu Leu Ala Gly Arg Arg Arg
435 440 445

Glu Leu
450

<210> 10
<211> 450
<212> PRT
<213> *Staphylococcus* sp.
<400> 10

Met Lys Lys Lys Asn Ile Tyr Ser Ile Arg Lys Leu Gly Val Gly Ile
1 5 10 15

Ala Ser Val Thr Leu Gly Thr Leu Leu Ile Ser Gly Gly Val Thr Pro
20 25 30

Ala Ala Asn Ala Ala Gln His Asp Glu Ala Gln Gln Asn Ala Phe Tyr
35 40 45

Gln Val Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Ala Asp Gln Arg Asn Gly Phe
50 55 60

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Val Leu Gly
65 70 75 80

Glu Ala Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys Ala Asp Ala Gln
85 90 95

Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile Leu
100 105 110

ES 2 655 701 T3

Asn	Met	Pro	Asn	Leu	Asn	Glu	Ala	Gln	Arg	Asn	Gly	Phe	Ile	Gln	Ser	115	120	125
Leu	Lys	Asp	Asp	Pro	Ser	Gln	Ser	Thr	Asn	Val	Leu	Gly	Glu	Ala	Lys	130	135	140
Lys	Leu	Asn	Glu	Ser	Gln	Ala	Pro	Lys	Ala	Asp	Asn	Asn	Phe	Asn	Lys	145	150	155
Glu	Gln	Gln	Asn	Ala	Phe	Tyr	Glu	Ile	Leu	Asn	Met	Pro	Asn	Leu	Asn	165	170	175
Glu	Glu	Gln	Arg	Asn	Gly	Phe	Ile	Gln	Ser	Leu	Lys	Asp	Asp	Pro	Ser	180	185	190
Gln	Ser	Ala	Asn	Leu	Leu	Ser	Glu	Ala	Lys	Lys	Leu	Asn	Glu	Ser	Gln	195	200	205
Ala	Pro	Lys	Ala	Asp	Asn	Lys	Phe	Asn	Lys	Glu	Gln	Gln	Asn	Ala	Phe	210	215	220
Tyr	Glu	Ile	Leu	His	Leu	Pro	Asn	Leu	Asn	Glu	Glu	Gln	Arg	Asn	Gly	225	230	235
Phe	Ile	Gln	Ser	Leu	Lys	Asp	Asp	Pro	Ser	Val	Ser	Lys	Glu	Ile	Leu	245	250	255
Ala	Glu	Ala	Lys	Lys	Leu	Asn	Asp	Ala	Gln	Ala	Pro	Lys	Glu	Glu	Asp	260	265	270
Asn	Lys	Lys	Pro	Gly	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	Lys	Pro	Gly	Lys	Glu	Asp	275	280	285
Gly	Asn	Lys	Pro	Gly	Lys	Glu	Asp	Asn	Lys	Lys	Pro	Gly	Lys	Glu	Asp	290	295	300
Gly	Asn	Lys	Pro	Gly	Lys	Glu	Asp	Asn	Asn	Lys	Pro	Gly	Lys	Glu	Asp	305	310	315
Gly	Asn	Lys	Pro	Gly	Lys	Glu	Asp	Asn	Asn	Lys	Pro	Gly	Lys	Glu	Asp	325	330	335
Gly	Asn	Lys	Pro	Gly	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	Lys	Pro	Gly	Lys	Glu	Asp	340	345	350
Gly	Asn	Gly	Val	His	Val	Val	Lys	Pro	Gly	Asp	Thr	Val	Asn	Asp	Ile	355	360	365

ES 2 655 701 T3

Ala Lys Ala Asn Gly Thr Thr Ala Asp Lys Ile Ala Ala Asp Asn Lys
370 375 380

Leu Ala Asp Lys Asn Met Ile Lys Pro Gly Gln Glu Leu Val Val Asp
385 390 395 400

Lys Lys Gln Pro Ala Asn His Ala Asp Ala Asn Lys Ala Gln Ala Leu
405 410 415

Pro Glu Thr Gly Glu Glu Asn Pro Phe Ile Gly Thr Thr Val Phe Gly
420 425 430

Gly Leu Ser Leu Ala Leu Gly Ala Ala Leu Leu Ala Gly Arg Arg Arg
435 440 445

Glu Leu
450

<210> 11
<211> 97
<212> PRT
<213> *Staphylococcus sp.*

<400> 11

Met Ala Met Ile Lys Met Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala Lys Ser Gln
1 5 10 15

Ser Tyr Gly Gln Gly Ser Asp Gln Ile Arg Gln Ile Leu Ser Asp Leu
20 25 30

Thr Arg Ala Gln Gly Glu Ile Ala Ala Asn Trp Glu Gly Gln Ala Phe
35 40 45

Ser Arg Phe Glu Glu Gln Phe Gln Gln Leu Ser Pro Lys Val Glu Lys
50 55 60

Phe Ala Gln Leu Leu Glu Glu Ile Lys Gln Gln Leu Asn Ser Thr Ala
65 70 75 80

Asp Ala Val Gln Glu Gln Asp Gln Gln Leu Ser Asn Asn Phe Gly Leu
85 90 95

Gln

<210> 12
<211> 102
<212> PRT
<213> *Staphylococcus sp.*

ES 2 655 701 T3

<400> 12

```

Met Gly Gly Tyr Lys Gly Ile Lys Ala Asp Gly Gly Lys Val Asn Gln
 1             5             10             15

Ala Lys Gln Leu Ala Ala Lys Ile Ala Lys Asp Ile Glu Ala Cys Gln
          20             25             30

Lys Gln Thr Gln Gln Leu Ala Glu Tyr Ile Glu Gly Ser Asp Trp Glu
          35             40             45

Gly Gln Phe Ala Asn Lys Val Lys Asp Val Leu Leu Ile Met Ala Lys
 50             55             60

Phe Gln Glu Glu Leu Val Gln Pro Met Ala Asp His Gln Lys Ala Ile
65             70             75             80

Asp Asn Leu Ser Gln Asn Leu Ala Lys Tyr Asp Thr Leu Ser Ile Lys
          85             90             95

Gln Gly Leu Asp Arg Val
          100

```

5 <210> 13
 <211> 1385
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus* sp.

10 <400> 13

```

Met Leu Asn Arg Glu Asn Lys Thr Ala Ile Thr Arg Lys Gly Met Val
 1             5             10             15

Ser Asn Arg Leu Asn Lys Phe Ser Ile Arg Lys Tyr Thr Val Gly Thr
          20             25             30

Ala Ser Ile Leu Val Gly Thr Thr Leu Ile Phe Gly Leu Gly Asn Gln
          35             40             45

Glu Ala Lys Ala Ala Glu Ser Thr Asn Lys Glu Leu Asn Glu Ala Thr
          50             55             60

Thr Ser Ala Ser Asp Asn Gln Ser Ser Asp Lys Val Asp Met Gln Gln
65             70             75             80

Leu Asn Gln Glu Asp Asn Thr Lys Asn Asp Asn Gln Lys Glu Met Val
          85             90             95

```

ES 2 655 701 T3

```

Ser Ser Gln Gly Asn Glu Thr Thr Ser Asn Gly Asn Lys Ser Ile Glu
      100                      105                      110

Lys Glu Ser Val Gln Ser Thr Thr Gly Asn Lys Val Glu Val Ser Thr
      115                      120                      125

Ala Lys Ser Asp Glu Gln Ala Ser Pro Lys Ser Thr Asn Glu Asp Leu
      130                      135                      140

Asn Thr Lys Gln Thr Ile Ser Asn Gln Glu Gly Leu Gln Pro Asp Leu
      145                      150                      155                      160

Leu Glu Asn Lys Ser Val Val Asn Val Gln Pro Thr Asn Glu Glu Asn
      165                      170                      175

Lys Lys Val Asp Ala Lys Thr Glu Ser Thr Thr Leu Asn Val Lys Ser
      180                      185                      190

Asp Ala Ile Lys Ser Asn Ala Glu Thr Leu Val Asp Asn Asn Ser Asn
      195                      200                      205

Ser Asn Asn Glu Asn Asn Ala Asp Ile Ile Leu Pro Lys Ser Thr Ala
      210                      215                      220

Pro Lys Ser Leu Asn Thr Arg Met Arg Met Ala Ala Ile Gln Pro Asn
      225                      230                      235                      240

Ser Thr Asp Ser Lys Asn Val Asn Asp Leu Ile Thr Ser Asn Thr Thr
      245                      250                      255

Leu Thr Val Val Asp Ala Asp Asn Ser Lys Thr Ile Val Pro Ala Gln
      260                      265                      270

Asp Tyr Leu Ser Leu Lys Ser Gln Ile Thr Val Asp Asp Lys Val Lys
      275                      280                      285

Ser Gly Asp Tyr Phe Thr Ile Lys Tyr Ser Asp Thr Val Gln Val Tyr
      290                      295                      300

Gly Leu Asn Pro Glu Asp Ile Lys Asn Ile Gly Asp Ile Lys Asp Pro
      305                      310                      315                      320

Asn Asn Gly Glu Thr Ile Ala Thr Ala Lys His Asp Thr Ala Asn Asn
      325                      330                      335

Leu Ile Thr Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Val Asp Arg Phe Asn Ser Val
      340                      345                      350

```


ES 2 655 701 T3

Lys	Met	Gly	Ile	Asn	Tyr	Ser	Ile	Tyr	Met	Asp	Ala	Asp	Thr	Ile	Pro	355	360	365
Val	Asp	Lys	Lys	Asp	Val	Pro	Phe	Ser	Val	Thr	Ile	Gly	Asn	Gln	Ile	370	375	380
Thr	Thr	Thr	Thr	Ala	Asp	Ile	Thr	Tyr	Pro	Ala	Tyr	Lys	Glu	Ala	Asp	385	390	400
Asn	Asn	Ser	Ile	Gly	Ser	Ala	Phe	Thr	Glu	Thr	Val	Ser	His	Val	Gly	405	410	415
Asn	Val	Glu	Asp	Pro	Gly	Tyr	Tyr	Asn	Gln	Val	Val	Tyr	Val	Asn	Pro	420	425	430
Met	Asp	Lys	Asp	Leu	Lys	Gly	Ala	Lys	Leu	Lys	Val	Glu	Ala	Tyr	His	435	440	445
Pro	Lys	Tyr	Pro	Thr	Asn	Ile	Gly	Gln	Ile	Asn	Gln	Asn	Val	Thr	Asn	450	455	460
Ile	Lys	Ile	Tyr	Arg	Val	Pro	Glu	Gly	Tyr	Thr	Leu	Asn	Lys	Gly	Tyr	465	470	475
Asp	Val	Asn	Thr	Asn	Asp	Leu	Val	Asp	Val	Thr	Asp	Glu	Phe	Lys	Asn	485	490	495
Lys	Met	Thr	Tyr	Gly	Ser	Asn	Gln	Ser	Val	Asn	Leu	Asp	Phe	Gly	Asp	500	505	510
Ile	Thr	Ser	Ala	Tyr	Val	Val	Met	Val	Asn	Thr	Lys	Phe	Gln	Tyr	Thr	515	520	525
Asn	Ser	Glu	Ser	Pro	Thr	Leu	Val	Gln	Met	Ala	Thr	Leu	Ser	Ser	Thr	530	535	540
Gly	Asn	Lys	Ser	Val	Ser	Thr	Gly	Asn	Ala	Leu	Gly	Phe	Thr	Asn	Asn	545	550	555
Gln	Ser	Gly	Gly	Ala	Gly	Gln	Glu	Val	Tyr	Lys	Ile	Gly	Asn	Tyr	Val	565	570	575
Trp	Glu	Asp	Thr	Asn	Lys	Asn	Gly	Val	Gln	Glu	Leu	Gly	Glu	Lys	Gly	580	585	590
Val	Gly	Asn	Val	Thr	Val	Thr	Val	Phe	Asp	Asn	Asn	Thr	Asn	Thr	Lys	595	600	605

ES 2 655 701 T3

Val	Gly	Glu	Ala	Val	Thr	Lys	Glu	Asp	Gly	Ser	Tyr	Leu	Ile	Pro	Asn	
610						615					620					
Leu	Pro	Asn	Gly	Asp	Tyr	Arg	Val	Glu	Phe	Ser	Asn	Leu	Pro	Lys	Gly	
625					630					635					640	
Tyr	Glu	Val	Thr	Pro	Ser	Lys	Gln	Gly	Asn	Asn	Glu	Glu	Leu	Asp	Ser	
				645					650					655		
Asn	Gly	Leu	Ser	Ser	Val	Ile	Thr	Val	Asn	Gly	Lys	Asp	Asn	Leu	Ser	
			660					665					670			
Ala	Asp	Leu	Gly	Ile	Tyr	Lys	Pro	Lys	Tyr	Asn	Leu	Gly	Asp	Tyr	Val	
		675					680					685				
Trp	Glu	Asp	Thr	Asn	Lys	Asn	Gly	Ile	Gln	Asp	Gln	Asp	Glu	Lys	Gly	
	690					695					700					
Ile	Ser	Gly	Val	Thr	Val	Thr	Leu	Lys	Asp	Glu	Asn	Gly	Asn	Val	Leu	
705					710					715					720	
Lys	Thr	Val	Thr	Thr	Asp	Ala	Asp	Gly	Lys	Tyr	Lys	Phe	Thr	Asp	Leu	
				725					730					735		
Asp	Asn	Gly	Asn	Tyr	Lys	Val	Glu	Phe	Thr	Thr	Pro	Glu	Gly	Tyr	Thr	
			740					745					750			
Pro	Thr	Thr	Val	Thr	Ser	Gly	Ser	Asp	Ile	Glu	Lys	Asp	Ser	Asn	Gly	
		755					760					765				
Leu	Thr	Thr	Thr	Gly	Val	Ile	Asn	Gly	Ala	Asp	Asn	Met	Thr	Leu	Asp	
	770					775					780					
Ser	Gly	Phe	Tyr	Lys	Thr	Pro	Lys	Tyr	Asn	Leu	Gly	Asn	Tyr	Val	Trp	
785					790					795					800	
Glu	Asp	Thr	Asn	Lys	Asp	Gly	Lys	Gln	Asp	Ser	Thr	Glu	Lys	Gly	Ile	
				805					810					815		
Ser	Gly	Val	Thr	Val	Thr	Leu	Lys	Asn	Glu	Asn	Gly	Glu	Val	Leu	Gln	
				820				825					830			
Thr	Thr	Lys	Thr	Asp	Lys	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gln	Phe	Thr	Gly	Leu	Glu	
		835					840					845				
Asn	Gly	Thr	Tyr	Lys	Val	Glu	Phe	Glu	Thr	Pro	Ser	Gly	Tyr	Thr	Pro	

ES 2 655 701 T3

850	855	860
Thr Gln Val Gly Ser Gly Thr Asp Glu Gly Ile Asp Ser Asn Gly Thr 865 870 875 880		
Ser Thr Thr Gly Val Ile Lys Asp Lys Asp Asn Asp Thr Ile Asp Ser 885 890 895		
Gly Phe Tyr Lys Pro Thr Tyr Asn Leu Gly Asp Tyr Val Trp Glu Asp 900 905 910		
Thr Asn Lys Asn Gly Val Gln Asp Lys Asp Glu Lys Gly Ile Ser Gly 915 920 925		
Val Thr Val Thr Leu Lys Asp Glu Asn Asp Lys Val Leu Lys Thr Val 930 935 940		
Thr Thr Asp Glu Asn Gly Lys Tyr Gln Phe Thr Asp Leu Asn Asn Gly 945 950 955 960		
Thr Tyr Lys Val Glu Phe Glu Thr Pro Ser Gly Tyr Thr Pro Thr Ser 965 970 975		
Val Thr Ser Gly Asn Asp Thr Glu Lys Asp Ser Asn Gly Leu Thr Thr 980 985 990		
Thr Gly Val Ile Lys Asp Ala Asp Asn Met Thr Leu Asp Ser Gly Phe 995 1000 1005		
Tyr Lys Thr Pro Lys Tyr Ser Leu Gly Asp Tyr Val Trp Tyr Asp 1010 1015 1020		
Ser Asn Lys Asp Gly Lys Gln Asp Ser Thr Glu Lys Gly Ile Lys 1025 1030 1035		
Asp Val Lys Val Ile Leu Leu Asn Glu Lys Gly Glu Val Ile Gly 1040 1045 1050		
Thr Thr Lys Thr Asp Glu Asn Gly Lys Tyr Arg Phe Asp Asn Leu 1055 1060 1065		
Asp Ser Gly Lys Tyr Lys Val Ile Phe Glu Lys Pro Thr Gly Leu 1070 1075 1080		
Thr Gln Thr Gly Thr Asn Thr Thr Glu Asp Asp Lys Asp Ala Asp 1085 1090 1095		

ES 2 655 701 T3

Gly	Gly	Glu	Val	Asp	Val	Thr	Ile	Thr	Asp	His	Asp	Asp	Phe	Thr
	1100					1105					1110			
Leu	Asp	Asn	Gly	Tyr	Tyr	Glu	Glu	Glu	Thr	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser
	1115					1120					1125			
Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp
	1130					1135					1140			
Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser
	1145					1150					1155			
Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp
	1160					1165					1170			
Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser
	1175					1180					1185			
Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp
	1190					1195					1200			
Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser
	1205					1210					1215			
Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp
	1220					1225					1230			
Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser
	1235					1240					1245			
Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp
	1250					1255					1260			
Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser
	1265					1270					1275			
Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp
	1280					1285					1290			
Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser
	1295					1300					1305			
Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp
	1310					1315					1320			
Ser	Asp	Ala	Gly	Lys	His	Thr	Pro	Val	Lys	Pro	Met	Ser	Thr	Thr
	1325					1330					1335			

ES 2 655 701 T3

Lys Asp His His Asn Lys Ala Lys Ala Leu Pro Glu Thr Gly Asn
1340 1345 1350

Glu Asn Ser Gly Ser Asn Asn Ala Thr Leu Phe Gly Gly Leu Phe
1355 1360 1365

Ala Ala Leu Gly Ser Leu Leu Leu Phe Gly Arg Arg Lys Lys Gln
1370 1375 1380

Asn Lys
1385

<210> 14

<211> 1141

<212> PRT

<213> *Staphylococcus sp.*

<400> 14

Met Ile Asn Arg Asp Asn Lys Lys Ala Ile Thr Lys Lys Gly Met Ile
1 5 10 15

Ser Asn Arg Leu Asn Lys Phe Ser Ile Arg Lys Tyr Thr Val Gly Thr
20 25 30

Ala Ser Ile Leu Val Gly Thr Thr Leu Ile Phe Gly Leu Gly Asn Gln
35 40 45

Glu Ala Lys Ala Ala Glu Asn Thr Ser Thr Glu Asn Ala Lys Gln Asp
50 55 60

Asp Ala Thr Thr Ser Asp Asn Lys Glu Val Val Ser Glu Thr Glu Asn
65 70 75 80

Asn Ser Thr Thr Glu Asn Asp Ser Thr Asn Pro Ile Lys Lys Glu Thr
85 90 95

Asn Thr Asp Ser Gln Pro Glu Ala Lys Glu Glu Ser Thr Thr Ser Ser
100 105 110

Thr Gln Gln Gln Gln Asn Asn Val Thr Ala Thr Thr Glu Thr Lys Pro
115 120 125

Gln Asn Ile Glu Lys Glu Asn Val Lys Pro Ser Thr Asp Lys Thr Ala
130 135 140

Thr Glu Asp Thr Ser Val Ile Leu Glu Glu Lys Lys Ala Pro Asn Tyr
145 150 155 160

5

10

ES 2 655 701 T3

Thr	Asn	Asn	Asp	Val	Thr	Thr	Lys	Pro	Ser	Thr	Ser	Glu	Ile	Gln	Thr	165	170	175
Lys	Pro	Thr	Thr	Pro	Gln	Glu	Ser	Thr	Asn	Ile	Glu	Asn	Ser	Gln	Pro	180	185	190
Gln	Pro	Thr	Pro	Ser	Lys	Val	Asp	Asn	Gln	Val	Thr	Asp	Ala	Thr	Asn	195	200	205
Pro	Lys	Glu	Pro	Val	Asn	Val	Ser	Lys	Glu	Glu	Leu	Lys	Asn	Asn	Pro	210	215	220
Glu	Lys	Leu	Lys	Glu	Leu	Val	Arg	Asn	Asp	Asn	Asn	Thr	Asp	Arg	Ser	225	230	235
Thr	Lys	Pro	Val	Ala	Thr	Ala	Pro	Thr	Ser	Val	Ala	Pro	Lys	Arg	Leu	245	250	255
Asn	Ala	Lys	Met	Arg	Phe	Ala	Val	Ala	Gln	Pro	Ala	Ala	Val	Ala	Ser	260	265	270
Asn	Asn	Val	Asn	Asp	Leu	Ile	Thr	Val	Thr	Lys	Gln	Thr	Ile	Lys	Val	275	280	285
Gly	Asp	Gly	Lys	Asp	Asn	Val	Ala	Ala	Ala	His	Asp	Gly	Lys	Asp	Ile	290	295	300
Glu	Tyr	Asp	Thr	Glu	Phe	Thr	Ile	Asp	Asn	Lys	Val	Lys	Lys	Gly	Asp	305	310	315
Thr	Met	Thr	Ile	Asn	Tyr	Asp	Lys	Asn	Val	Ile	Pro	Ser	Asp	Leu	Thr	325	330	335
Asp	Lys	Asn	Asp	Pro	Ile	Asp	Ile	Thr	Asp	Pro	Ser	Gly	Glu	Val	Ile	340	345	350
Ala	Lys	Gly	Thr	Phe	Asp	Lys	Ala	Thr	Lys	Gln	Ile	Thr	Tyr	Thr	Phe	355	360	365
Thr	Asp	Tyr	Val	Asp	Lys	Tyr	Glu	Asp	Ile	Lys	Ala	Arg	Leu	Thr	Leu	370	375	380
Tyr	Ser	Tyr	Ile	Asp	Lys	Gln	Ala	Val	Pro	Asn	Glu	Thr	Ser	Leu	Asn	385	390	395
Leu	Thr	Phe	Ala	Thr	Ala	Gly	Lys	Glu	Thr	Ser	Gln	Asn	Val	Ser	Val	405	410	415

ES 2 655 701 T3

Asp Tyr Gln Asp Pro Met Val His Gly Asp Ser Asn Ile Gln Ser Ile
 420 425 430
 Phe Thr Lys Leu Asp Glu Asn Lys Gln Thr Ile Glu Gln Gln Ile Tyr
 435 440 445
 Val Asn Pro Leu Lys Lys Thr Ala Thr Asn Thr Lys Val Asp Ile Ala
 450 455 460
 Gly Ser Gln Val Asp Asp Tyr Gly Asn Ile Lys Leu Gly Asn Gly Ser
 465 470 475 480
 Thr Ile Ile Asp Gln Asn Thr Glu Ile Lys Val Tyr Lys Val Asn Pro
 485 490 495
 Asn Gln Gln Leu Pro Gln Ser Asn Arg Ile Tyr Asp Phe Ser Gln Tyr
 500 505 510
 Glu Asp Val Thr Ser Gln Phe Asp Asn Lys Lys Ser Phe Ser Asn Asn
 515 520 525
 Val Ala Thr Leu Asp Phe Gly Asp Ile Asn Ser Ala Tyr Ile Ile Lys
 530 535 540
 Val Val Ser Lys Tyr Thr Pro Thr Ser Asp Gly Glu Leu Asp Ile Ala
 545 550 555 560
 Gln Gly Thr Ser Met Arg Thr Thr Asp Lys Tyr Gly Tyr Tyr Asn Tyr
 565 570 575
 Ala Gly Tyr Ser Asn Phe Ile Val Thr Ser Asn Asp Thr Gly Gly Gly
 580 585 590
 Asp Gly Thr Val Lys Pro Glu Glu Lys Leu Tyr Lys Ile Gly Asp Tyr
 595 600 605
 Val Trp Glu Asp Val Asp Lys Asp Gly Val Gln Gly Thr Asp Ser Lys
 610 615 620
 Glu Lys Pro Met Ala Asn Val Leu Val Thr Leu Thr Tyr Pro Asp Gly
 625 630 635 640
 Thr Thr Lys Ser Val Arg Thr Asp Ala Asn Gly His Tyr Glu Phe Gly
 645 650 655
 Gly Leu Lys Asp Gly Glu Thr Tyr Thr Val Lys Phe Glu Thr Pro Ala

ES 2 655 701 T3

660							665							670						
Gly	Tyr	Leu	Pro	Thr	Lys	Val	Asn	Gly	Thr	Thr	Asp	Gly	Glu	Lys	Asp					
		675					680					685								
Ser	Asn	Gly	Ser	Ser	Ile	Thr	Val	Lys	Ile	Asn	Gly	Lys	Asp	Asp	Met					
	690					695					700									
Ser	Leu	Asp	Thr	Gly	Phe	Tyr	Lys	Glu	Pro	Lys	Tyr	Asn	Leu	Gly	Asp					
705					710					715					720					
Tyr	Val	Trp	Glu	Asp	Thr	Asn	Lys	Asp	Gly	Ile	Gln	Asp	Ala	Asn	Glu					
				725					730					735						
Pro	Gly	Ile	Lys	Asp	Val	Lys	Val	Thr	Leu	Lys	Asp	Ser	Thr	Gly	Lys					
			740					745					750							
Val	Ile	Gly	Thr	Thr	Thr	Thr	Asp	Ala	Ser	Gly	Lys	Tyr	Lys	Phe	Thr					
		755					760					765								
Asp	Leu	Asp	Asn	Gly	Asn	Tyr	Thr	Val	Glu	Phe	Glu	Thr	Pro	Ala	Gly					
	770					775					780									
Tyr	Thr	Pro	Thr	Val	Lys	Asn	Thr	Thr	Ala	Glu	Asp	Lys	Asp	Ser	Asn					
785					790					795					800					
Gly	Leu	Thr	Thr	Thr	Gly	Val	Ile	Lys	Asp	Ala	Asp	Asn	Met	Thr	Leu					
				805					810					815						
Asp	Ser	Gly	Phe	Tyr	Lys	Thr	Pro	Lys	Tyr	Ser	Leu	Gly	Asp	Tyr	Val					
			820					825					830							
Trp	Tyr	Asp	Ser	Asn	Lys	Asp	Gly	Lys	Gln	Asp	Ser	Thr	Glu	Lys	Gly					
		835					840					845								
Ile	Lys	Asp	Val	Lys	Val	Thr	Leu	Leu	Asn	Glu	Lys	Gly	Glu	Val	Ile					
	850					855					860									
Gly	Thr	Thr	Lys	Thr	Asp	Glu	Asn	Gly	Lys	Tyr	Arg	Phe	Asp	Asn	Leu					
865					870					875					880					
Asp	Ser	Gly	Lys	Tyr	Lys	Val	Ile	Phe	Glu	Lys	Pro	Ala	Gly	Leu	Thr					
				885					890					895						
Gln	Thr	Val	Thr	Asn	Thr	Thr	Glu	Asp	Asp	Lys	Asp	Ala	Asp	Gly	Gly					
			900					905						910						

ES 2 655 701 T3

Glu Val Asp Val Thr Ile Thr Asp His Asp Asp Phe Thr Leu Asp Asn
 915 920 925
 Gly Tyr Phe Glu Glu Asp Thr Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 930 935 940
 Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 945 950 955 960
 Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 965 970 975
 Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 980 985 990
 Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Se
 995 1000 1005
 Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp
 1010 1015 1020
 Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 1025 1030 1035
 Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp
 1040 1045 1050
 Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 1055 1060 1065
 Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ala Gly
 1070 1075 1080
 Lys His Thr Pro Val Lys Pro Met Ser Thr Thr Lys Asp His His
 1085 1090 1095
 Asn Lys Ala Lys Ala Leu Pro Glu Thr Gly Ser Glu Asn Asn Gly
 1100 1105 1110
 Ser Asn Asn Ala Thr Leu Phe Gly Gly Leu Phe Ala Ala Leu Gly
 1115 1120 1125
 Ser Leu Leu Leu Phe Gly Arg Arg Lys Lys Gln Asn Lys
 1130 1135 1140

<210> 15
 <211> 350

ES 2 655 701 T3

<212> PRT

<213> *Staphylococcus sp.*

<400> 15

5

```

Met Thr Lys His Tyr Leu Asn Ser Lys Tyr Gln Ser Glu Gln Arg Ser
 1          5          10          15

Ser Ala Met Lys Lys Ile Thr Met Gly Thr Ala Ser Ile Ile Leu Gly
 20          25          30

Ser Leu Val Tyr Ile Gly Ala Asp Ser Gln Gln Val Asn Ala Ala Thr
 35          40          45

Glu Ala Thr Asn Ala Thr Asn Asn Gln Ser Thr Gln Val Ser Gln Ala
 50          55          60

Thr Ser Gln Pro Ile Asn Phe Gln Val Gln Lys Asp Gly Ser Ser Glu
 65          70          75          80

Lys Ser His Met Asp Asp Tyr Met Gln His Pro Gly Lys Val Ile Lys
 85          90          95

Gln Asn Asn Lys Tyr Tyr Phe Gln Thr Val Leu Asn Asn Ala Ser Phe
100          105          110

Trp Lys Glu Tyr Lys Phe Tyr Asn Ala Asn Asn Gln Glu Leu Ala Thr
115          120          125

Thr Val Val Asn Asp Asn Lys Lys Ala Asp Thr Arg Thr Ile Asn Val
130          135          140

Ala Val Glu Pro Gly Tyr Lys Ser Leu Thr Thr Lys Val His Ile Val
145          150          155          160

Val Pro Gln Ile Asn Tyr Asn His Arg Tyr Thr Thr His Leu Glu Phe
165          170          175

Glu Lys Ala Ile Pro Thr Leu Ala Asp Ala Ala Lys Pro Asn Asn Val
180          185          190

Lys Pro Val Gln Pro Lys Pro Ala Gln Pro Lys Thr Pro Thr Glu Gln
195          200          205

Thr Lys Pro Val Gln Pro Lys Val Glu Lys Val Lys Pro Thr Val Thr
210          215          220

Thr Thr Ser Lys Val Glu Asp Asn His Ser Thr Lys Val Val Ser Thr
225          230          235          240

```

ES 2 655 701 T3

```

Asp Thr Thr Lys Asp Gln Thr Lys Thr Gln Thr Ala His Thr Val Lys
      245                                250                                255

Thr Ala Gln Thr Ala Gln Glu Gln Asn Lys Val Gln Thr Pro Val Lys
      260                                265                                270

Asp Val Ala Thr Ala Lys Ser Glu Ser Asn Asn Gln Ala Val Ser Asp
      275                                280                                285

Asn Lys Ser Gln Gln Thr Asn Lys Val Thr Lys His Asn Glu Thr Pro
      290                                295                                300

Lys Gln Ala Ser Lys Ala Lys Glu Leu Pro Lys Thr Gly Leu Thr Ser
      305                                310                                315                                320

Val Asp Asn Phe Ile Ser Thr Val Ala Phe Ala Thr Leu Ala Leu Leu
      325                                330                                335

Gly Ser Leu Ser Leu Leu Leu Phe Lys Arg Lys Glu Ser Lys
      340                                345                                350

```

<210> 16
 <211> 645
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus* sp.
 <400> 16

```

Met Asn Lys Gln Gln Lys Glu Phe Lys Ser Phe Tyr Ser Ile Arg Lys
  1                                5                                10                                15

Ser Ser Leu Gly Val Ala Ser Val Ala Ile Ser Thr Leu Leu Leu Leu
      20                                25                                30

Met Ser Asn Gly Glu Ala Gln Ala Ala Ala Glu Glu Thr Gly Gly Thr
      35                                40                                45

Asn Thr Glu Ala Gln Pro Lys Thr Glu Ala Val Ala Ser Pro Thr Thr
      50                                55                                60

Thr Ser Glu Lys Ala Pro Glu Thr Lys Pro Val Ala Asn Ala Val Ser
      65                                70                                75                                80

Val Ser Asn Lys Glu Val Glu Ala Pro Thr Ser Glu Thr Lys Glu Ala
      85                                90                                95

Lys Glu Val Lys Glu Val Lys Ala Pro Lys Glu Thr Lys Ala Val Lys
      100                                105                                110

```

ES 2 655 701 T3

Pro	Ala	Ala	Lys	Ala	Thr	Asn	Asn	Thr	Tyr	Pro	Ile	Leu	Asn	Gln	Glu
		115					120					125			
Leu	Arg	Glu	Ala	Ile	Lys	Asn	Pro	Ala	Ile	Lys	Asp	Lys	Asp	His	Ser
	130					135					140				
Ala	Pro	Asn	Ser	Arg	Pro	Ile	Asp	Phe	Glu	Met	Lys	Lys	Glu	Asn	Gly
145					150					155					160
Glu	Gln	Gln	Phe	Tyr	His	Tyr	Ala	Ser	Ser	Val	Lys	Pro	Ala	Arg	Val
				165					170					175	
Ile	Phe	Thr	Asp	Ser	Lys	Pro	Glu	Ile	Glu	Leu	Gly	Leu	Gln	Ser	Gly
			180					185					190		
Gln	Phe	Trp	Arg	Lys	Phe	Glu	Val	Tyr	Glu	Gly	Asp	Lys	Lys	Leu	Pro
		195					200					205			
Ile	Lys	Leu	Val	Ser	Tyr	Asp	Thr	Val	Lys	Asp	Tyr	Ala	Tyr	Ile	Arg
	210					215					220				
Phe	Ser	Val	Ser	Asn	Gly	Thr	Lys	Ala	Val	Lys	Ile	Val	Ser	Ser	Thr
225					230					235					240
His	Phe	Asn	Asn	Lys	Glu	Glu	Lys	Tyr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Met	Glu	Phe
				245					250					255	
Ala	Gln	Pro	Ile	Tyr	Asn	Ser	Ala	Asp	Lys	Phe	Lys	Thr	Glu	Glu	Asp
			260					265					270		
Tyr	Lys	Ala	Glu	Lys	Leu	Leu	Ala	Pro	Tyr	Lys	Lys	Ala	Lys	Thr	Leu
		275					280					285			
Glu	Arg	Gln	Val	Tyr	Glu	Leu	Asn	Lys	Ile	Gln	Asp	Lys	Leu	Pro	Glu
	290					295					300				
Lys	Leu	Lys	Ala	Glu	Tyr	Lys	Lys	Lys	Leu	Glu	Asp	Thr	Lys	Lys	Ala
305					310					315					320
Leu	Asp	Glu	Gln	Val	Lys	Ser	Ala	Ile	Thr	Glu	Phe	Gln	Asn	Val	Gln
				325					330					335	
Pro	Thr	Asn	Glu	Lys	Met	Thr	Asp	Leu	Gln	Asp	Thr	Lys	Tyr	Val	Val
			340					345					350		
Tyr	Glu	Ser	Val	Glu	Asn	Asn	Glu	Ser	Met	Met	Asp	Thr	Phe	Val	Lys
		355					360					365			

ES 2 655 701 T3

His Pro Ile Lys Thr Gly Met Leu Asn Gly Lys Lys Tyr Met Val Met
 370 375 380

Glu Thr Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Lys Asp Phe Met Val Glu Gly Gln
 385 390 395 400

Arg Val Arg Thr Ile Ser Lys Asp Ala Lys Asn Asn Thr Arg Thr Ile
 405 410 415

Ile Phe Pro Tyr Val Glu Gly Lys Thr Leu Tyr Asp Ala Ile Val Lys
 420 425 430

Val His Val Lys Thr Ile Asp Tyr Asp Gly Gln Tyr His Val Arg Ile
 435 440 445

Val Asp Lys Glu Ala Phe Thr Lys Ala Asn Thr Asp Lys Ser Asn Lys
 450 455 460

Lys Glu Gln Gln Asp Asn Ser Ala Lys Lys Glu Ala Thr Pro Ala Thr
 465 470 475 480

Pro Ser Lys Pro Thr Pro Ser Pro Val Glu Lys Glu Ser Gln Lys Gln
 485 490 495

Asp Ser Gln Lys Asp Asp Asn Lys Gln Leu Pro Ser Val Glu Lys Glu
 500 505 510

Asn Asp Ala Ser Ser Glu Ser Gly Lys Asp Lys Thr Pro Ala Thr Lys
 515 520 525

Pro Thr Lys Gly Glu Val Glu Ser Ser Ser Thr Thr Pro Thr Lys Val
 530 535 540

Val Ser Thr Thr Gln Asn Val Ala Lys Pro Thr Thr Ala Ser Ser Lys
 545 550 555 560

Thr Thr Lys Asp Val Val Gln Thr Ser Ala Gly Ser Ser Glu Ala Lys
 565 570 575

Asp Ser Ala Pro Leu Gln Lys Ala Asn Ile Lys Asn Thr Asn Asp Gly
 580 585 590

His Thr Gln Ser Gln Asn Asn Lys Asn Thr Gln Glu Asn Lys Ala Lys
 595 600 605

Ser Leu Pro Gln Thr Gly Glu Glu Ser Asn Lys Asp Met Thr Leu Pro

ES 2 655 701 T3

610

615

620

Leu Met Ala Leu Leu Ala Leu Ser Ser Ile Val Ala Phe Val Leu Pro
625 630 635 640

Arg Lys Arg Lys Asn
645

<210> 17
<211> 80
<212> PRT
<213> *Staphylococcus sp.*
<400> 17

Met Asn Gln His Val Lys Val Thr Phe Asp Phe Thr Asn Tyr Asn Tyr
1 5 10 15

Gly Thr Tyr Asp Leu Ala Val Pro Ala Tyr Leu Pro Ile Lys Asn Leu
20 25 30

Ile Ala Leu Val Leu Asp Ser Leu Asp Ile Ser Ile Phe Asp Val Asn
35 40 45

Thr Gln Ile Lys Val Met Thr Lys Gly Gln Leu Leu Val Glu Asn Asp
50 55 60

Arg Leu Ile Asp Tyr Gln Ile Ala Asp Gly Asp Ile Leu Lys Leu Leu
65 70 75 80

<210> 18
<211> 877
<212> PRT
<213> *Staphylococcus sp.*
<400> 18

Met Lys Lys Arg Ile Asp Tyr Leu Ser Asn Lys Gln Asn Lys Tyr Ser
1 5 10 15

Ile Arg Arg Phe Thr Val Gly Thr Thr Ser Val Ile Val Gly Ala Thr
20 25 30

Ile Leu Phe Gly Ile Gly Asn His Gln Ala Gln Ala Ser Glu Gln Ser
35 40 45

Asn Asp Thr Thr Gln Ser Ser Lys Asn Asn Ala Ser Ala Asp Ser Glu
50 55 60

Lys Asn Asn Met Ile Glu Thr Pro Gln Leu Asn Thr Thr Ala Asn Asp
65 70 75 80

ES 2 655 701 T3

Thr	Ser	Asp	Ile	Ser	Ala	Asn	Thr	Asn	Ser	Ala	Asn	Val	Asp	Ser	Thr	85	90	95
Thr	Lys	Pro	Met	Ser	Thr	Gln	Thr	Ser	Asn	Thr	Thr	Thr	Thr	Glu	Pro	100	105	110
Ala	Ser	Thr	Asn	Glu	Thr	Pro	Gln	Pro	Thr	Ala	Ile	Lys	Asn	Gln	Ala	115	120	125
Thr	Ala	Ala	Lys	Met	Gln	Asp	Gln	Thr	Val	Pro	Gln	Glu	Ala	Asn	Ser	130	135	140
Gln	Val	Asp	Asn	Lys	Thr	Thr	Asn	Asp	Ala	Asn	Ser	Ile	Ala	Thr	Asn	145	150	155
Ser	Glu	Leu	Lys	Asn	Ser	Gln	Thr	Leu	Asp	Leu	Pro	Gln	Ser	Ser	Pro	165	170	175
Gln	Thr	Ile	Ser	Asn	Ala	Gln	Gly	Thr	Ser	Lys	Pro	Ser	Val	Arg	Thr	180	185	190
Arg	Ala	Val	Arg	Ser	Leu	Ala	Val	Ala	Glu	Pro	Val	Val	Asn	Ala	Ala	195	200	205
Asp	Ala	Lys	Gly	Thr	Asn	Val	Asn	Asp	Lys	Val	Thr	Ala	Ser	Asn	Phe	210	215	220
Lys	Leu	Glu	Lys	Thr	Thr	Phe	Asp	Pro	Asn	Gln	Ser	Gly	Asn	Thr	Phe	225	230	235
Met	Ala	Ala	Asn	Phe	Thr	Val	Thr	Asp	Lys	Val	Lys	Ser	Gly	Asp	Tyr	245	250	255
Phe	Thr	Ala	Lys	Leu	Pro	Asp	Ser	Leu	Thr	Gly	Asn	Gly	Asp	Val	Asp	260	265	270
Tyr	Ser	Asn	Ser	Asn	Asn	Thr	Met	Pro	Ile	Ala	Asp	Ile	Lys	Ser	Thr	275	280	285
Asn	Gly	Asp	Val	Val	Ala	Lys	Ala	Thr	Tyr	Asp	Ile	Leu	Thr	Lys	Thr	290	295	300
Tyr	Thr	Phe	Val	Phe	Thr	Asp	Tyr	Val	Asn	Asn	Lys	Glu	Asn	Ile	Asn	305	310	315
Gly	Gln	Phe	Ser	Leu	Pro	Leu	Phe	Thr	Asp	Arg	Ala	Lys	Ala	Pro	Lys			

ES 2 655 701 T3

325										330					335				
Ser	Gly	Thr	Tyr	Asp	Ala	Asn	Ile	Asn	Ile	Ala	Asp	Glu	Met	Phe	Asn				
			340					345					350						
Asn	Lys	Ile	Thr	Tyr	Asn	Tyr	Ser	Ser	Pro	Ile	Ala	Gly	Ile	Asp	Lys				
		355					360					365							
Pro	Asn	Gly	Ala	Asn	Ile	Ser	Ser	Gln	Ile	Ile	Gly	Val	Asp	Thr	Ala				
	370					375					380								
Ser	Gly	Gln	Asn	Thr	Tyr	Lys	Gln	Thr	Val	Phe	Val	Asn	Pro	Lys	Gln				
385					390					395					400				
Arg	Val	Leu	Gly	Asn	Thr	Trp	Val	Tyr	Ile	Lys	Gly	Tyr	Gln	Asp	Lys				
				405					410					415					
Ile	Glu	Glu	Ser	Ser	Gly	Lys	Val	Ser	Ala	Thr	Asp	Thr	Lys	Leu	Arg				
			420					425					430						
Ile	Phe	Glu	Val	Asn	Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Ser	Asp	Ser	Tyr	Tyr	Ala				
	435						440					445							
Asp	Pro	Asn	Asp	Ser	Asn	Leu	Lys	Glu	Val	Thr	Asp	Gln	Phe	Lys	Asn				
	450					455					460								
Arg	Ile	Tyr	Tyr	Glu	His	Pro	Asn	Val	Ala	Ser	Ile	Lys	Phe	Gly	Asp				
465					470					475					480				
Ile	Thr	Lys	Thr	Tyr	Val	Val	Leu	Val	Glu	Gly	His	Tyr	Asp	Asn	Thr				
				485					490					495					
Gly	Lys	Asn	Leu	Lys	Thr	Gln	Val	Ile	Gln	Glu	Asn	Val	Asp	Pro	Val				
			500					505					510						
Thr	Asn	Arg	Asp	Tyr	Ser	Ile	Phe	Gly	Trp	Asn	Asn	Glu	Asn	Val	Val				
		515					520					525							
Arg	Tyr	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Asp	Gly	Asp	Ser	Ala	Val	Asn	Pro	Lys				
	530					535					540								
Asp	Pro	Thr	Pro	Gly	Pro	Pro	Val	Asp	Pro	Glu	Pro	Ser	Pro	Asp	Pro				
545					550					555					560				
Glu	Pro	Glu	Pro	Thr	Pro	Asp	Pro	Glu	Pro	Ser	Pro	Asp	Pro	Glu	Pro				
				565				570						575					

ES 2 655 701 T3

Glu Pro Ser Pro Asp Pro Asp Pro Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 580 585 590

Gly Ser Asp Ser Asp Ser Gly Ser Asp Ser Asp Ser Glu Ser Asp Ser
 595 600 605

Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Glu Ser
 610 615 620

Asp Ser Asp Ser Glu Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 625 630 635 640

Asp Ser Asp Ser Asp Ser Glu Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 645 650 655

Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Glu Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Glu Ser
 660 665 670

Asp Ser Glu Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 675 680 685

Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 690 695 700

Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Glu Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 705 710 715 720

Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 725 730 735

Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 740 745 750

Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 755 760 765

Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 770 775 780

Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 785 790 795 800

Asp Ser Asp Ser Arg Val Thr Pro Pro Asn Asn Glu Gln Lys Ala Pro
 805 810 815

Ser Asn Pro Lys Gly Glu Val Asn His Ser Asn Lys Val Ser Lys Gln
 820 825 830

ES 2 655 701 T3

His Lys Thr Asp Ala Leu Pro Glu Thr Gly Asp Lys Ser Glu Asn Thr
835 840 845

Asn Ala Thr Leu Phe Gly Ala Met Met Ala Leu Leu Gly Ser Leu Leu
850 855 860

Leu Phe Arg Lys Arg Lys Gln Asp His Lys Glu Lys Ala
865 870 875

<210> 19
<211> 227
<212> PRT
<213> *Staphylococcus* sp.

<400> 19

Met Lys Asn Ile Leu Lys Val Phe Asn Thr Thr Ile Leu Ala Leu Ile
1 5 10 15

Ile Ile Ile Ala Thr Phe Ser Asn Ser Ala Asn Ala Ala Asp Ser Gly
20 25 30

Thr Leu Asn Tyr Glu Val Tyr Lys Tyr Asn Thr Asn Asp Thr Ser Ile
35 40 45

Ala Asn Asp Tyr Phe Asn Lys Pro Ala Lys Tyr Ile Lys Lys Asn Gly
50 55 60

Lys Leu Tyr Val Gln Ile Thr Val Asn His Ser His Trp Ile Thr Gly
65 70 75 80

Met Ser Ile Glu Gly His Lys Glu Asn Ile Ile Ser Lys Asn Thr Ala
85 90 95

Lys Asp Glu Arg Thr Ser Glu Phe Glu Val Ser Lys Leu Asn Gly Lys
100 105 110

Ile Asp Gly Lys Ile Asp Val Tyr Ile Asp Glu Lys Val Asn Gly Lys
115 120 125

Pro Phe Lys Tyr Asp His His Tyr Asn Ile Thr Tyr Lys Phe Asn Gly
130 135 140

Pro Thr Asp Val Ala Gly Ala Asn Ala Pro Gly Lys Asp Asp Lys Asn
145 150 155 160

Ser Ala Ser Gly Ser Asp Lys Gly Ser Asp Gly Thr Thr Thr Gly Gln
165 170 175

5

10

ES 2 655 701 T3

Ser Glu Ser Asn Ser Ser Asn Lys Asp Lys Val Glu Asn Pro Gln Thr
180 185 190

Asn Ala Gly Thr Pro Ala Tyr Ile Tyr Ala Ile Pro Val Ala Ser Leu
195 200 205

Ala Leu Leu Ile Ala Ile Thr Leu Phe Val Arg Lys Lys Ser Lys Gly
210 215 220

Asn Val Glu
225

<210> 20
<211> 635
<212> PRT
<213> *Staphylococcus sp.*

<400> 20

Met Ala Lys Tyr Arg Gly Lys Pro Phe Gln Leu Tyr Val Lys Leu Ser
1 5 10 15

Cys Ser Thr Met Met Ala Ser Ser Ile Ile Leu Thr Asn Ile Leu Pro
20 25 30

Tyr Asp Ala Gln Ala Ala Ser Glu Lys Asp Thr Glu Ile Ser Lys Glu
35 40 45

Ile Leu Ser Lys Gln Asp Leu Leu Asp Lys Val Asp Lys Ala Ile Arg
50 55 60

Gln Ile Glu Gln Leu Lys Gln Leu Ser Ala Ser Ser Lys Ala His Tyr
65 70 75 80

Lys Ala Gln Leu Asn Glu Ala Lys Thr Ala Ser Gln Ile Asp Glu Ile
85 90 95

Ile Lys Arg Ala Asn Glu Leu Asp Ser Lys Glu Asn Lys Ser Ser His
100 105 110

Thr Glu Met Asn Gly Gln Ser Asp Ile Asp Ser Lys Leu Asp Gln Leu
115 120 125

Leu Lys Asp Leu Asn Glu Val Ser Ser Asn Val Asp Arg Gly Gln Gln
130 135 140

Ser Gly Glu Asp Asp Leu Asn Ala Met Lys Asn Asp Met Ser Gln Thr
145 150 155 160

5

10

ES 2 655 701 T3

Ala	Thr	Thr	Lys	Tyr	Gly	Glu	Lys	Asp	Asp	Lys	Asn	Asp	Glu	Ala	Met	
				165					170					175		
Val	Asn	Lys	Ala	Leu	Glu	Asp	Leu	Asp	His	Leu	Asn	Gln	Gln	Ile	His	
			180					185					190			
Lys	Ser	Lys	Asp	Ala	Leu	Lys	Asp	Ala	Ser	Lys	Asp	Pro	Ala	Val	Ser	
		195					200					205				
Thr	Thr	Asp	Ser	Asn	His	Glu	Val	Ala	Lys	Thr	Pro	Asn	Asn	Asp	Gly	
	210					215					220					
Ser	Gly	His	Val	Val	Leu	Asn	Lys	Phe	Leu	Ser	Asn	Glu	Glu	Asn	Gln	
225					230					235					240	
Ser	His	Ser	Asn	Gln	Leu	Thr	Asp	Lys	Leu	Gln	Gly	Ser	Asp	Lys	Ile	
				245					250					255		
Asn	His	Ala	Met	Ile	Glu	Lys	Leu	Ala	Lys	Ser	Asn	Ala	Ser	Thr	Gln	
			260					265					270			
His	Tyr	Thr	Tyr	His	Lys	Leu	Asn	Thr	Leu	Gln	Ser	Leu	Asp	Gln	Arg	
		275					280					285				
Ile	Ala	Asn	Thr	Gln	Leu	Pro	Lys	Asn	Gln	Lys	Ser	Asp	Leu	Met	Ser	
	290					295					300					
Glu	Val	Asn	Lys	Thr	Lys	Glu	Arg	Ile	Lys	Ser	Gln	Arg	Asn	Ile	Ile	
305					310					315					320	
Leu	Glu	Glu	Leu	Ala	Arg	Thr	Asp	Asp	Lys	Lys	Tyr	Ala	Thr	Gln	Ser	
				325					330					335		
Ile	Leu	Glu	Ser	Ile	Phe	Asn	Lys	Asp	Glu	Ala	Asp	Lys	Ile	Leu	Lys	
			340					345					350			
Asp	Ile	Arg	Val	Asp	Gly	Lys	Thr	Asp	Gln	Gln	Ile	Ala	Asp	Gln	Ile	
		355					360					365				
Thr	Arg	His	Ile	Asp	Gln	Leu	Ser	Leu	Thr	Thr	Ser	Asp	Asp	Leu	Leu	
	370					375					380					
Thr	Ser	Leu	Ile	Asp	Gln	Ser	Gln	Asp	Lys	Ser	Leu	Leu	Ile	Ser	Gln	
385					390					395					400	
Ile	Leu	Gln	Thr	Lys	Leu	Gly	Lys	Ala	Glu	Ala	Asp	Lys	Leu	Ala	Lys	
				405					410					415		

ES 2 655 701 T3

Asp Trp Thr Asn Lys Gly Leu Ser Asn Arg Gln Ile Val Asp Gln Leu
 420 425 430
 Lys Lys His Phe Ala Ser Thr Gly Asp Thr Ser Ser Asp Asp Ile Leu
 435 440 445
 Lys Ala Ile Leu Asn Asn Ala Lys Asp Lys Lys Gln Ala Ile Glu Thr
 450 455 460
 Ile Leu Ala Thr Arg Ile Glu Arg Gln Lys Ala Lys Leu Leu Ala Asp
 465 470 475 480
 Leu Ile Thr Lys Ile Glu Thr Asp Gln Asn Lys Ile Phe Asn Leu Val
 485 490 495
 Lys Ser Ala Leu Asn Gly Lys Ala Asp Asp Leu Leu Asn Leu Gln Lys
 500 505 510
 Arg Leu Asn Gln Thr Lys Lys Asp Ile Asp Tyr Ile Leu Ser Pro Ile
 515 520 525
 Val Asn Arg Pro Ser Leu Leu Asp Arg Leu Asn Lys Asn Gly Lys Thr
 530 535 540
 Thr Asp Leu Asn Lys Leu Ala Asn Leu Met Asn Gln Gly Ser Asn Leu
 545 550 555 560
 Leu Asp Ser Ile Pro Asp Ile Pro Thr Pro Lys Pro Glu Lys Thr Leu
 565 570 575
 Thr Leu Gly Lys Gly Asn Gly Leu Leu Ser Gly Leu Leu Asn Ala Asp
 580 585 590
 Gly Asn Val Ser Leu Pro Lys Ala Gly Glu Thr Ile Lys Glu His Trp
 595 600 605
 Leu Pro Ile Ser Val Ile Val Gly Ala Met Gly Val Leu Met Ile Trp
 610 615 620
 Leu Ser Arg Arg Asn Lys Leu Lys Asn Lys Ala
 625 630 635

<210> 21
 <211> 953
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus sp.*

<400> 21

ES 2 655 701 T3

Met	Asn	Asn	Lys	Lys	Thr	Ala	Thr	Asn	Arg	Lys	Gly	Met	Ile	Pro	Asn	
1				5					10					15		
Arg	Leu	Asn	Lys	Phe	Ser	Ile	Arg	Lys	Tyr	Ser	Val	Gly	Thr	Ala	Ser	
			20					25					30			
Ile	Leu	Val	Gly	Thr	Thr	Leu	Ile	Phe	Gly	Leu	Ser	Gly	His	Glu	Ala	
		35					40					45				
Lys	Ala	Ala	Glu	His	Thr	Asn	Gly	Glu	Leu	Asn	Gln	Ser	Lys	Asn	Glu	
	50					55					60					
Thr	Thr	Ala	Pro	Ser	Glu	Asn	Lys	Thr	Thr	Glu	Lys	Val	Asp	Ser	Arg	
65					70					75					80	
Gln	Leu	Lys	Asp	Asn	Thr	Gln	Thr	Ala	Thr	Ala	Asp	Gln	Pro	Lys	Val	
				85					90					95		
Thr	Met	Ser	Asp	Ser	Ala	Thr	Val	Lys	Glu	Thr	Ser	Ser	Asn	Met	Gln	
			100					105					110			
Ser	Pro	Gln	Asn	Ala	Thr	Ala	Ser	Gln	Ser	Thr	Thr	Gln	Thr	Ser	Asn	
		115					120					125				
Val	Thr	Thr	Asn	Asp	Lys	Ser	Ser	Thr	Thr	Tyr	Ser	Asn	Glu	Thr	Asp	
	130					135					140					
Lys	Ser	Asn	Leu	Thr	Gln	Ala	Lys	Asn	Val	Ser	Thr	Thr	Pro	Lys	Thr	
145					150					155					160	
Thr	Thr	Ile	Lys	Gln	Arg	Ala	Leu	Asn	Arg	Met	Ala	Val	Asn	Thr	Val	
				165					170					175		
Ala	Ala	Pro	Gln	Gln	Gly	Thr	Asn	Val	Asn	Asp	Lys	Val	His	Phe	Thr	
			180					185					190			
Asn	Ile	Asp	Ile	Ala	Ile	Asp	Lys	Gly	His	Val	Asn	Lys	Thr	Thr	Gly	
		195					200					205				
Asn	Thr	Glu	Phe	Trp	Ala	Thr	Ser	Ser	Asp	Val	Leu	Lys	Leu	Lys	Ala	
	210					215					220					
Asn	Tyr	Thr	Ile	Asp	Asp	Ser	Val	Lys	Glu	Gly	Asp	Thr	Phe	Thr	Phe	
225					230					235					240	
Lys	Tyr	Gly	Gln	Tyr	Phe	Arg	Pro	Gly	Ser	Val	Arg	Leu	Pro	Ser	Gln	

ES 2 655 701 T3

245					250					255					
Thr	Gln	Asn	Leu	Tyr	Asn	Ala	Gln	Gly	Asn	Ile	Ile	Ala	Lys	Gly	Ile
			260					265					270		
Tyr	Asp	Ser	Lys	Thr	Asn	Thr	Thr	Thr	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr	Val
		275					280					285			
Asp	Gln	Tyr	Thr	Asn	Val	Ser	Gly	Ser	Phe	Glu	Gln	Val	Ala	Phe	Ala
	290					295					300				
Lys	Arg	Glu	Asn	Ala	Thr	Thr	Asp	Lys	Thr	Ala	Tyr	Lys	Met	Glu	Val
305						310					315				320
Thr	Leu	Gly	Asn	Asp	Thr	Tyr	Ser	Lys	Asp	Val	Ile	Val	Asp	Tyr	Gly
				325					330					335	
Asn	Gln	Lys	Gly	Gln	Gln	Leu	Ile	Ser	Ser	Thr	Asn	Tyr	Ile	Asn	Asn
			340					345					350		
Glu	Asp	Leu	Ser	Arg	Asn	Met	Thr	Val	Tyr	Val	Asn	Gln	Pro	Lys	Lys
		355					360					365			
Thr	Tyr	Thr	Lys	Glu	Thr	Phe	Val	Thr	Asn	Leu	Thr	Gly	Tyr	Lys	Phe
	370					375					380				
Asn	Pro	Asp	Ala	Lys	Asn	Phe	Lys	Ile	Tyr	Glu	Val	Thr	Asp	Gln	Asn
385						390					395				400
Gln	Phe	Val	Asp	Ser	Phe	Thr	Pro	Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Lys	Asp	Val
				405					410					415	
Thr	Gly	Gln	Phe	Asp	Val	Ile	Tyr	Ser	Asn	Asp	Asn	Lys	Thr	Ala	Thr
			420					425					430		
Val	Asp	Leu	Leu	Asn	Gly	Gln	Ser	Ser	Ser	Asp	Lys	Gln	Tyr	Ile	Ile
		435					440					445			
Gln	Gln	Val	Ala	Tyr	Pro	Asp	Asn	Ser	Ser	Thr	Asp	Asn	Gly	Lys	Ile
	450					455					460				
Asp	Tyr	Thr	Leu	Glu	Thr	Gln	Asn	Gly	Lys	Ser	Ser	Trp	Ser	Asn	Ser
465						470					475				480
Tyr	Ser	Asn	Val	Asn	Gly	Ser	Ser	Thr	Ala	Asn	Gly	Asp	Gln	Lys	Lys
				485					490					495	

ES 2 655 701 T3

Tyr Asn Leu Gly Asp Tyr Val Trp Glu Asp Thr Asn Lys Asp Gly Lys
 500 505 510
 Gln Asp Ala Asn Glu Lys Gly Ile Lys Gly Val Tyr Val Ile Leu Lys
 515 520 525
 Asp Ser Asn Gly Lys Glu Leu Asp Arg Thr Thr Thr Asp Glu Asn Gly
 530 535 540
 Lys Tyr Gln Phe Thr Gly Leu Ser Asn Gly Thr Tyr Ser Val Glu Phe
 545 550 555 560
 Ser Thr Pro Ala Gly Tyr Thr Pro Thr Thr Ala Asn Ala Gly Thr Asp
 565 570 575
 Asp Ala Val Asp Ser Asp Gly Leu Thr Thr Thr Gly Val Ile Lys Asp
 580 585 590
 Ala Asp Asn Met Thr Leu Asp Ser Gly Phe Tyr Lys Thr Pro Lys Tyr
 595 600 605
 Ser Leu Gly Asp Tyr Val Trp Tyr Asp Ser Asn Lys Asp Gly Lys Gln
 610 615 620
 Asp Ser Thr Glu Lys Gly Ile Lys Gly Val Lys Val Thr Leu Gln Asn
 625 630 635 640
 Glu Lys Gly Glu Val Ile Gly Thr Thr Glu Thr Asp Glu Asn Gly Lys
 645 650 655
 Tyr Arg Phe Asp Asn Leu Asp Ser Gly Lys Tyr Lys Val Ile Phe Glu
 660 665 670
 Lys Pro Ala Gly Leu Thr Gln Thr Gly Thr Asn Thr Thr Glu Asp Asp
 675 680 685
 Lys Asp Ala Asp Gly Gly Glu Val Asp Val Thr Ile Thr Asp His Asp
 690 695 700
 Asp Phe Thr Leu Asp Asn Gly Tyr Tyr Glu Glu Glu Thr Ser Asp Ser
 705 710 715 720
 Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 725 730 735
 Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 740 745 750

ES 2 655 701 T3

Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
755 760 765

Asp Ser Asp Ser Glu Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
770 775 780

Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
785 790 795 800

Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
805 810 815

Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Asn Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
820 825 830

Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
835 840 845

Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
850 855 860

Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
865 870 875 880

Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Ala Gly Lys
885 890 895

His Thr Pro Thr Lys Pro Met Ser Thr Val Lys Asp Gln His Lys Thr
900 905 910

Ala Lys Ala Leu Pro Glu Thr Gly Ser Glu Asn Asn Asn Ser Asn Asn
915 920 925

Gly Thr Leu Phe Gly Gly Leu Phe Ala Ala Leu Gly Ser Leu Leu Leu
930 935 940

Phe Gly Arg Arg Lys Lys Gln Asn Lys
945 950

<210> 22
<211> 989
<212> PRT
<213> *Staphylococcus sp.*

<400> 22

Met Asn Met Lys Lys Lys Glu Lys His Ala Ile Arg Lys Lys Ser Ile
1 5 10 15

ES 2 655 701 T3

Gly	Val	Ala	Ser	Val	Leu	Val	Gly	Thr	Leu	Ile	Gly	Phe	Gly	Leu	Leu
		20					25					30			
Ser	Ser	Lys	Glu	Ala	Asp	Ala	Ser	Glu	Asn	Ser	Val	Thr	Gln	Ser	Asp
		35					40					45			
Ser	Ala	Ser	Asn	Glu	Ser	Lys	Ser	Asn	Asp	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Ala
	50					55					60				
Ala	Pro	Lys	Thr	Asp	Asp	Thr	Asn	Val	Ser	Asp	Thr	Lys	Thr	Ser	Ser
65					70					75					80
Asn	Thr	Asn	Asn	Gly	Glu	Thr	Ser	Val	Ala	Gln	Asn	Pro	Ala	Gln	Gln
				85					90					95	
Glu	Thr	Thr	Gln	Ser	Ser	Ser	Thr	Asn	Ala	Thr	Thr	Glu	Glu	Thr	Pro
			100					105					110		
Val	Thr	Gly	Glu	Ala	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Asn	Gln	Ala	Asn	Thr	Pro
		115					120					125			
Ala	Thr	Thr	Gln	Ser	Ser	Asn	Thr	Asn	Ala	Glu	Glu	Leu	Val	Asn	Gln
	130					135					140				
Thr	Ser	Asn	Glu	Thr	Thr	Ser	Asn	Asp	Thr	Asn	Thr	Val	Ser	Ser	Val
145					150					155					160
Asn	Ser	Pro	Gln	Asn	Ser	Thr	Asn	Ala	Glu	Asn	Val	Ser	Thr	Thr	Gln
			165					170						175	
Asp	Thr	Ser	Thr	Glu	Ala	Thr	Pro	Ser	Asn	Asn	Glu	Ser	Ala	Pro	Gln
			180					185					190		
Asn	Thr	Asp	Ala	Ser	Asn	Lys	Asp	Val	Val	Ser	Gln	Ala	Val	Asn	Pro
		195					200					205			
Ser	Thr	Pro	Arg	Met	Arg	Ala	Phe	Ser	Leu	Ala	Ala	Val	Ala	Ala	Asp
	210					215					220				
Ala	Pro	Ala	Ala	Gly	Thr	Asp	Ile	Thr	Asn	Gln	Leu	Thr	Asp	Val	Lys
225					230					235					240
Val	Thr	Ile	Asp	Ser	Gly	Thr	Thr	Val	Tyr	Pro	His	Gln	Ala	Gly	Tyr
				245					250					255	
Val	Lys	Leu	Asn	Tyr	Gly	Phe	Ser	Val	Pro	Asn	Ser	Ala	Val	Lys	Gly
			260					265					270		

ES 2 655 701 T3

Asp Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val
 275 280 285
 Thr Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu
 290 295 300
 Ala Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr
 305 310 315 320
 Asp Tyr Val Asp Asn Lys Glu Asn Val Thr Ala Asn Ile Thr Met Pro
 325 330 335
 Ala Tyr Ile Asp Pro Glu Asn Val Thr Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu
 340 345 350
 Thr Thr Gly Ile Gly Thr Asn Thr Ala Ser Lys Thr Val Leu Ile Asp
 355 360 365
 Tyr Glu Lys Tyr Gly Gln Phe His Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile
 370 375 380
 Asp Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val
 385 390 395 400
 Asn Pro Ser Gly Asp Asn Val Val Leu Pro Ala Leu Thr Gly Asn Leu
 405 410 415
 Ile Pro Asn Thr Lys Ser Asn Ala Leu Ile Asp Ala Lys Asn Thr Asp
 420 425 430
 Ile Lys Val Tyr Arg Val Asp Asn Ala Asn Asp Leu Ser Glu Ser Tyr
 435 440 445
 Tyr Val Asn Pro Ser Asp Phe Glu Asp Val Thr Asn Gln Val Arg Ile
 450 455 460
 Ser Phe Pro Asn Ala Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Pro Thr Asp Asp
 465 470 475 480
 Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp
 485 490 495
 Pro Ala Ser Thr Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Phe Tyr Gly Tyr
 500 505 510
 Asp Ser Asn Phe Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala

ES 2 655 701 T3

515					520					525					
Phe	Asn	Asn	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Asp	Gly	Ile	Asp	Lys	Pro	Val	Val
	530					535					540				
Pro	Glu	Gln	Pro	Asp	Glu	Pro	Gly	Glu	Ile	Glu	Pro	Ile	Pro	Glu	Asp
545					550					555					560
Ser	Asp	Ser	Asp	Pro	Gly	Ser	Asp	Ser	Gly	Ser	Asp	Ser	Asn	Ser	Asp
				565					570					575	
Ser	Gly	Ser	Asp	Ser	Gly	Ser	Asp	Ser	Thr	Ser	Asp	Ser	Gly	Ser	Asp
			580					585					590		
Ser	Ala	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Ala	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Ala	Ser	Asp
		595					600					605			
Ser	Asp	Ser	Ala	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Ala	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Ala
	610					615					620				
Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Ala	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Ala	Ser	Asp	Ser	Asp
625					630					635					640
Ser	Ala	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Ala	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Ala	Ser	Asp
				645					650					655	
Ser	Asp	Ser	Ala	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Ala	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp
			660					665					670		
Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp
		675					680					685			
Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp
	690					695					700				
Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp
705					710					715					720
Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp
				725					730					735	
Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp
			740					745					750		
Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp
		755					760					765			

ES 2 655 701 T3

Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp
 770 775 780
 Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp
 785 790 795 800
 Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp
 805 810 815
 Ser Asp Ser Asp Ser Ala Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Glu
 820 825 830
 Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp
 835 840 845
 Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Glu Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp
 850 855 860
 Ser Asp Ser Glu Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp
 865 870 875 880
 Ser Ala Ser Asp Ser Asp Ser Gly Ser Asp Ser Asp Ser Ser Ser Asp
 885 890 895
 Ser Asp Ser Asp Ser Thr Ser Asp Thr Gly Ser Asp Asn Asp Ser Asp
 900 905 910
 Ser Asp Ser Asn Ser Asp Ser Glu Ser Gly Ser Asn Asn Asn Val Val
 915 920 925
 Pro Pro Asn Ser Pro Lys Asn Gly Thr Asn Ala Ser Asn Lys Asn Glu
 930 935 940
 Ala Lys Asp Ser Lys Glu Pro Leu Pro Asp Thr Gly Ser Glu Asp Glu
 945 950 955 960
 Ala Asn Thr Ser Leu Ile Trp Gly Leu Leu Ala Ser Leu Gly Ser Leu
 965 970 975
 Leu Leu Phe Arg Arg Lys Lys Glu Asn Lys Asp Lys Lys
 980 985

<210> 23
 <211> 584
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus sp.*
 <400> 23

ES 2 655 701 T3

Met	Lys	Phe	Lys	Ser	Leu	Ile	Thr	Thr	Thr	Leu	Ala	Leu	Gly	Val	Leu	1	5	10	15
Ala	Ser	Thr	Gly	Ala	Asn	Phe	Asn	Asn	Asn	Glu	Ala	Ser	Ala	Ala	Ala	20	25	30	
Lys	Pro	Leu	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Ser	Leu	His	His	Gly	Tyr	Ser	Lys	35	40	45	
Val	His	Val	Pro	Tyr	Ala	Ile	Thr	Val	Asn	Gly	Thr	Ser	Gln	Asn	Ile	50	55	60	
Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Phe	Asn	Lys	Asn	Gln	Asn	Ile	Ser	Tyr	Lys	Asp	65	70	75	80
Leu	Glu	Asp	Arg	Val	Lys	Ser	Val	Leu	Lys	Ser	Asp	Arg	Gly	Ile	Ser	85	90	95	
Asp	Ile	Asp	Leu	Arg	Leu	Ser	Lys	Gln	Ala	Lys	Tyr	Thr	Val	Tyr	Phe	100	105	110	
Lys	Asn	Gly	Thr	Lys	Lys	Val	Ile	Asp	Leu	Lys	Ala	Gly	Ile	Tyr	Thr	115	120	125	
Ala	Asp	Leu	Ile	Asn	Thr	Ser	Glu	Ile	Lys	Ala	Ile	Asn	Ile	Asn	Val	130	135	140	
Asp	Thr	Lys	Lys	Gln	Val	Glu	Asp	Lys	Lys	Lys	Asp	Lys	Ala	Asn	Tyr	145	150	155	160
Gln	Val	Pro	Tyr	Thr	Ile	Thr	Val	Asn	Gly	Thr	Ser	Gln	Asn	Ile	Leu	165	170	175	
Ser	Asn	Leu	Thr	Phe	Asn	Lys	Asn	Gln	Asn	Ile	Ser	Tyr	Lys	Asp	Leu	180	185	190	
Glu	Asp	Lys	Val	Lys	Ser	Val	Leu	Glu	Ser	Asn	Arg	Gly	Ile	Thr	Asp	195	200	205	
Val	Asp	Leu	Arg	Leu	Ser	Lys	Gln	Ala	Lys	Tyr	Thr	Val	Asn	Phe	Lys	210	215	220	
Asn	Gly	Thr	Lys	Lys	Val	Ile	Asp	Leu	Lys	Ser	Gly	Ile	Tyr	Thr	Ala	225	230	235	240
Asn	Leu	Ile	Asn	Ser	Ser	Asp	Ile	Lys	Ser	Ile	Asn	Ile	Asn	Val	Asp	245	250	255	

ES 2 655 701 T3

Thr	Lys	Lys	His	Ile	Glu	Asn	Lys	Ala	Lys	Arg	Asn	Tyr	Gln	Val	Pro	260	265	270	
Tyr	Ser	Ile	Asn	Leu	Asn	Gly	Thr	Ser	Thr	Asn	Ile	Leu	Ser	Asn	Leu	275	280	285	
Ser	Phe	Ser	Asn	Lys	Pro	Trp	Thr	Asn	Tyr	Lys	Asn	Leu	Thr	Ser	Gln	290	295	300	
Ile	Lys	Ser	Val	Leu	Lys	His	Asp	Arg	Gly	Ile	Ser	Glu	Gln	Asp	Leu	305	310	315	320
Lys	Tyr	Ala	Lys	Lys	Ala	Tyr	Tyr	Thr	Val	Tyr	Phe	Lys	Asn	Gly	Gly	325	330	335	
Lys	Arg	Ile	Leu	Gln	Leu	Asn	Ser	Lys	Asn	Tyr	Thr	Ala	Asn	Leu	Val	340	345	350	
His	Ala	Lys	Asp	Val	Lys	Arg	Ile	Glu	Ile	Thr	Val	Lys	Thr	Gly	Thr	355	360	365	
Lys	Ala	Lys	Ala	Asp	Arg	Tyr	Val	Pro	Tyr	Thr	Ile	Ala	Val	Asn	Gly	370	375	380	
Thr	Ser	Thr	Pro	Ile	Leu	Ser	Asp	Leu	Lys	Phe	Thr	Gly	Asp	Pro	Arg	385	390	395	400
Val	Gly	Tyr	Lys	Asp	Ile	Ser	Lys	Lys	Val	Lys	Ser	Val	Leu	Lys	His	405	410	415	
Asp	Arg	Gly	Ile	Gly	Glu	Arg	Glu	Leu	Lys	Tyr	Ala	Lys	Lys	Ala	Thr	420	425	430	
Tyr	Thr	Val	His	Phe	Lys	Asn	Gly	Thr	Lys	Lys	Val	Ile	Asn	Ile	Asn	435	440	445	
Ser	Asn	Ile	Ser	Gln	Leu	Asn	Leu	Leu	Tyr	Val	Gln	Asp	Ile	Lys	Lys	450	455	460	
Ile	Asp	Ile	Asp	Val	Lys	Thr	Gly	Thr	Lys	Ala	Lys	Ala	Asp	Ser	Tyr	465	470	475	480
Val	Pro	Tyr	Thr	Ile	Ala	Val	Asn	Gly	Thr	Ser	Thr	Pro	Ile	Leu	Ser	485	490	495	
Lys	Leu	Lys	Ile	Ser	Asn	Lys	Gln	Leu	Ile	Ser	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Asn	500	505	510	

ES 2 655 701 T3

Asp Lys Val Lys Ser Val Leu Lys Ser Glu Arg Gly Ile Ser Asp Leu
515 520 525

Asp Leu Lys Phe Ala Lys Gln Ala Lys Tyr Thr Val Tyr Phe Lys Asn
530 535 540

Gly Lys Lys Gln Val Val Asn Leu Lys Ser Asp Ile Phe Thr Pro Asn
545 550 555 560

Leu Phe Ser Ala Lys Asp Ile Lys Lys Ile Asp Ile Asp Val Lys Gln
565 570 575

Tyr Thr Lys Ser Lys Lys Asn Lys
580

<210> 24
<211> 10419
<212> PRT
<213> *Staphylococcus sp.*
<400> 24

Met Asn Tyr Arg Asp Lys Ile Gln Lys Phe Ser Ile Arg Lys Tyr Thr
1 5 10 15

Val Gly Thr Phe Ser Thr Val Ile Ala Thr Leu Val Phe Leu Gly Phe
20 25 30

Asn Thr Ser Gln Ala His Ala Ala Glu Thr Asn Gln Pro Ala Ser Val
35 40 45

Val Lys Gln Lys Gln Gln Ser Asn Asn Glu Gln Thr Glu Asn Arg Glu
50 55 60

Ser Gln Val Gln Asn Ser Gln Asn Ser Gln Asn Gly Gln Ser Leu Ser
65 70 75 80

Ala Thr His Glu Asn Glu Gln Pro Asn Ile Ser Gln Ala Asn Leu Val
85 90 95

Asp Gln Lys Val Ala Gln Ser Ser Thr Thr Asn Asp Glu Gln Pro Ala
100 105 110

Ser Gln Asn Val Asn Thr Lys Lys Asp Ser Ala Thr Ala Ala Thr Thr
115 120 125

Gln Pro Asp Lys Glu Gln Ser Lys His Lys Gln Asn Glu Ser Gln Ser
130 135 140

ES 2 655 701 T3

Ala	Asn	Lys	Asn	Gly	Asn	Asp	Asn	Arg	Ala	Ala	His	Val	Glu	Asn	His	145	150	155	160
Glu	Ala	Asn	Val	Val	Thr	Ala	Ser	Asp	Ser	Ser	Asp	Asn	Gly	Asn	Val	165	170	175	
Gln	His	Asp	Arg	Asn	Glu	Leu	Gln	Ala	Phe	Phe	Asp	Ala	Asn	Tyr	His	180	185	190	
Asp	Tyr	Arg	Phe	Ile	Asp	Arg	Glu	Asn	Ala	Asp	Ser	Gly	Thr	Phe	Asn	195	200	205	
Tyr	Val	Lys	Gly	Ile	Phe	Asp	Lys	Ile	Asn	Thr	Leu	Leu	Gly	Ser	Asn	210	215	220	
Asp	Pro	Ile	Asn	Asn	Lys	Asp	Leu	Gln	Leu	Ala	Tyr	Lys	Glu	Leu	Glu	225	230	235	240
Gln	Ala	Val	Ala	Leu	Ile	Arg	Thr	Met	Pro	Gln	Arg	Gln	Gln	Thr	Ser	245	250	255	
Arg	Arg	Ser	Asn	Arg	Ile	Gln	Thr	Arg	Ser	Val	Glu	Ser	Arg	Ala	Ala	260	265	270	
Glu	Pro	Arg	Ser	Val	Ser	Asp	Tyr	Gln	Asn	Ala	Asn	Ser	Ser	Tyr	Tyr	275	280	285	
Val	Glu	Asn	Ala	Asn	Asp	Gly	Ser	Gly	Tyr	Pro	Val	Gly	Thr	Tyr	Ile	290	295	300	
Asn	Ala	Ser	Ser	Lys	Gly	Ala	Pro	Tyr	Asn	Leu	Pro	Thr	Thr	Pro	Trp	305	310	315	320
Asn	Thr	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Ser	Lys	Glu	Ile	Ala	Leu	Met	Thr	Ala	325	330	335	
Lys	Gln	Thr	Gly	Asp	Gly	Tyr	Gln	Trp	Val	Ile	Lys	Phe	Asn	Lys	Gly	340	345	350	
His	Ala	Pro	His	Gln	Asn	Met	Ile	Phe	Trp	Phe	Ala	Leu	Pro	Ala	Asp	355	360	365	
Gln	Val	Pro	Val	Gly	Arg	Thr	Asp	Phe	Val	Thr	Val	Asn	Ser	Asp	Gly	370	375	380	
Thr	Asn	Val	Gln	Trp	Ser	His	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Ala	Asn	Lys	Pro				

385					390						395					400
Leu	Gln	Gln	Met	Trp	Glu	Tyr	Gly	Val	Asn	Asp	Pro	His	Arg	Ser	His	
				405					410					415		
Asp	Phe	Lys	Ile	Arg	Asn	Arg	Ser	Gly	Gln	Val	Ile	Tyr	Asp	Trp	Pro	
			420					425					430			
Thr	Val	His	Ile	Tyr	Ser	Leu	Glu	Asp	Leu	Ser	Arg	Ala	Ser	Asp	Tyr	
		435					440					445				
Phe	Ser	Glu	Ala	Gly	Ala	Thr	Pro	Ala	Thr	Lys	Ala	Phe	Gly	Arg	Gln	
	450					455					460					
Asn	Phe	Glu	Tyr	Ile	Asn	Gly	Gln	Lys	Pro	Ala	Glu	Ser	Pro	Gly	Val	
465					470					475					480	
Pro	Lys	Val	Tyr	Thr	Phe	Ile	Gly	Gln	Gly	Asp	Ala	Ser	Tyr	Thr	Ile	
				485					490					495		
Ser	Phe	Lys	Thr	Gln	Gly	Pro	Thr	Val	Asn	Lys	Leu	Tyr	Tyr	Ala	Ala	
			500					505					510			
Gly	Gly	Arg	Ala	Leu	Glu	Tyr	Asn	Gln	Leu	Phe	Met	Tyr	Ser	Gln	Leu	
		515					520					525				
Tyr	Val	Glu	Ser	Thr	Gln	Asp	His	Gln	Gln	Arg	Leu	Asn	Gly	Leu	Arg	
	530					535					540					
Gln	Val	Val	Asn	Arg	Thr	Tyr	Arg	Ile	Gly	Thr	Thr	Lys	Arg	Val	Glu	
545					550					555					560	
Val	Ser	Gln	Gly	Asn	Val	Gln	Thr	Lys	Lys	Val	Leu	Glu	Ser	Thr	Asn	
				565					570					575		
Leu	Asn	Ile	Asp	Asp	Phe	Val	Asp	Asp	Pro	Leu	Ser	Tyr	Val	Lys	Thr	
			580					585					590			
Pro	Ser	Asn	Lys	Val	Leu	Gly	Phe	Tyr	Ser	Asn	Asn	Ala	Asn	Thr	Asn	
		595					600					605				
Ala	Phe	Arg	Pro	Gly	Gly	Ala	Gln	Gln	Leu	Asn	Glu	Tyr	Gln	Leu	Ser	
	610					615					620					
Gln	Leu	Phe	Thr	Asp	Gln	Lys	Leu	Gln	Glu	Ala	Ala	Arg	Thr	Arg	Asn	
625					630					635					640	

ES 2 655 701 T3

Pro	Ile	Arg	Leu	Met	Ile	Gly	Phe	Asp	Tyr	Pro	Asp	Ala	Tyr	Gly	Asn	
				645					650					655		
Ser	Glu	Thr	Leu	Val	Pro	Val	Asn	Leu	Thr	Val	Leu	Pro	Glu	Ile	Gln	
			660					665					670			
His	Asn	Ile	Lys	Phe	Phe	Lys	Asn	Asp	Asp	Thr	Gln	Asn	Ile	Ala	Glu	
		675					680					685				
Lys	Pro	Phe	Ser	Lys	Gln	Ala	Gly	His	Pro	Val	Phe	Tyr	Val	Tyr	Ala	
	690					695					700					
Gly	Asn	Gln	Gly	Asn	Ala	Ser	Val	Asn	Leu	Gly	Gly	Ser	Val	Thr	Ser	
705					710					715					720	
Ile	Gln	Pro	Leu	Arg	Ile	Asn	Leu	Thr	Ser	Asn	Glu	Asn	Phe	Thr	Asp	
				725					730					735		
Lys	Asp	Trp	Gln	Ile	Thr	Gly	Ile	Pro	Arg	Thr	Leu	His	Ile	Glu	Asn	
			740					745					750			
Ser	Thr	Asn	Arg	Pro	Asn	Asn	Ala	Arg	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Leu	Val	
		755					760					765				
Gly	Asn	Leu	Leu	Pro	Gly	Asp	Tyr	Phe	Gly	Thr	Ile	Arg	Phe	Gly	Arg	
	770					775					780					
Lys	Glu	Gln	Leu	Phe	Glu	Ile	Arg	Val	Lys	Pro	His	Thr	Pro	Thr	Ile	
785					790				795						800	
Thr	Thr	Thr	Ala	Glu	Gln	Leu	Arg	Gly	Thr	Ala	Leu	Gln	Lys	Val	Pro	
				805					810					815		
Val	Asn	Ile	Ser	Gly	Ile	Pro	Leu	Asp	Pro	Ser	Ala	Leu	Val	Tyr	Leu	
			820					825					830			
Val	Ala	Pro	Thr	Asn	Gln	Thr	Thr	Asn	Gly	Gly	Ser	Glu	Ala	Asp	Gln	
		835					840					845				
Ile	Pro	Ser	Gly	Tyr	Thr	Ile	Leu	Ala	Thr	Gly	Thr	Pro	Asp	Gly	Val	
	850					855					860					
His	Asn	Thr	Ile	Thr	Ile	Arg	Pro	Gln	Asp	Tyr	Val	Val	Phe	Ile	Pro	
865					870					875					880	
Pro	Val	Gly	Lys	Gln	Ile	Arg	Ala	Val	Val	Tyr	Tyr	Asn	Lys	Val	Val	
				885					890					895		

ES 2 655 701 T3

Ala	Ser	Asn	Met	Ser	Asn	Ala	Val	Thr	Ile	Leu	Pro	Asp	Asp	Ile	Pro	900	905	910
Pro	Thr	Ile	Asn	Asn	Pro	Val	Gly	Ile	Asn	Ala	Lys	Tyr	Tyr	Arg	Gly	915	920	925
Asp	Glu	Val	Asn	Phe	Thr	Met	Gly	Val	Ser	Asp	Arg	His	Ser	Gly	Ile	930	935	940
Lys	Asn	Thr	Thr	Ile	Thr	Thr	Leu	Pro	Asn	Gly	Trp	Thr	Ser	Asn	Leu	945	950	955
Thr	Lys	Ala	Asp	Lys	Asn	Asn	Gly	Ser	Leu	Ser	Ile	Thr	Gly	Arg	Val	965	970	975
Ser	Met	Asn	Gln	Ala	Phe	Asn	Ser	Asp	Ile	Thr	Phe	Lys	Val	Ser	Ala	980	985	990
Thr	Asp	Asn	Val	Asn	Asn	Thr	Thr	Asn	Asp	Ser	Gln	Ser	Lys	His	Val	995	1000	1005
Ser	Ile	His	Val	Gly	Lys	Ile	Ser	Glu	Asp	Ala	His	Pro	Ile	Val		1010	1015	1020
Leu	Gly	Asn	Thr	Glu	Lys	Val	Val	Val	Val	Asn	Pro	Thr	Ala	Val		1025	1030	1035
Ser	Asn	Asp	Glu	Lys	Gln	Ser	Ile	Ile	Thr	Ala	Phe	Met	Asn	Lys		1040	1045	1050
Asn	Gln	Asn	Ile	Arg	Gly	Tyr	Leu	Ala	Ser	Thr	Asp	Pro	Val	Thr		1055	1060	1065
Val	Asp	Asn	Asn	Gly	Asn	Val	Thr	Leu	His	Tyr	Arg	Asp	Gly	Ser		1070	1075	1080
Ser	Thr	Thr	Leu	Asp	Ala	Thr	Asn	Val	Met	Thr	Tyr	Glu	Pro	Val		1085	1090	1095
Val	Lys	Pro	Glu	Tyr	Gln	Thr	Val	Asn	Ala	Ala	Lys	Thr	Ala	Thr		1100	1105	1110
Val	Thr	Ile	Ala	Lys	Gly	Gln	Ser	Phe	Ser	Ile	Gly	Asp	Ile	Lys		1115	1120	1125
Gln	Tyr	Phe	Thr	Leu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Ile	Pro	Ser	Gly	Thr		1130	1135	1140

Phe	Thr	Asn	Ile	Thr	Ser	Asp	Arg	Thr	Ile	Pro	Thr	Ala	Gln	Glu
1145						1150					1155			
Val	Ser	Gln	Met	Asn	Ala	Gly	Thr	Gln	Leu	Tyr	His	Ile	Thr	Ala
1160						1165					1170			
Thr	Asn	Ala	Tyr	His	Lys	Asp	Ser	Glu	Asp	Phe	Tyr	Ile	Ser	Leu
1175						1180					1185			
Lys	Ile	Ile	Asp	Val	Lys	Gln	Pro	Glu	Gly	Asp	Gln	Arg	Val	Tyr
1190						1195					1200			
Arg	Thr	Ser	Thr	Tyr	Asp	Leu	Thr	Thr	Asp	Glu	Ile	Ser	Lys	Val
1205						1210					1215			
Lys	Gln	Ala	Phe	Ile	Asn	Ala	Asn	Arg	Asp	Val	Ile	Thr	Leu	Ala
1220						1225					1230			
Glu	Gly	Asp	Ile	Ser	Val	Thr	Asn	Thr	Pro	Asn	Gly	Ala	Asn	Val
1235						1240					1245			
Ser	Thr	Ile	Thr	Val	Asn	Ile	Asn	Lys	Gly	Arg	Leu	Thr	Lys	Ser
1250						1255					1260			
Phe	Ala	Ser	Asn	Leu	Ala	Asn	Met	Asn	Phe	Leu	Arg	Trp	Val	Asn
1265						1270					1275			
Phe	Pro	Gln	Asp	Tyr	Thr	Val	Thr	Trp	Thr	Asn	Ala	Lys	Ile	Ala
1280						1285					1290			
Asn	Arg	Pro	Thr	Asp	Gly	Gly	Leu	Ser	Trp	Ser	Asp	Asp	His	Lys
1295						1300					1305			
Ser	Leu	Ile	Tyr	Arg	Tyr	Asp	Ala	Thr	Leu	Gly	Thr	Gln	Ile	Thr
1310						1315					1320			
Thr	Asn	Asp	Ile	Leu	Thr	Met	Leu	Lys	Ala	Thr	Thr	Thr	Val	Pro
1325						1330					1335			
Gly	Leu	Arg	Asn	Asn	Ile	Thr	Gly	Asn	Glu	Lys	Ser	Gln	Ala	Glu
1340						1345					1350			
Ala	Gly	Gly	Arg	Pro	Asn	Phe	Arg	Thr	Thr	Gly	Tyr	Ser	Gln	Ser
1355						1360					1365			
Asn	Ala	Thr	Thr	Asp	Gly	Gln	Arg	Gln	Phe	Thr	Leu	Asn	Gly	Gln

1370						1375						1380			
Val	Ile	Gln	Val	Leu	Asp	Ile	Ile	Asn	Pro	Ser	Asn	Gly	Tyr	Gly	
1385						1390					1395				
Gly	Gln	Pro	Val	Thr	Asn	Ser	Asn	Thr	Arg	Ala	Asn	His	Ser	Asn	
1400						1405					1410				
Ser	Thr	Val	Val	Asn	Val	Asn	Glu	Pro	Ala	Ala	Asn	Gly	Ala	Gly	
1415						1420					1425				
Ala	Phe	Thr	Ile	Asp	His	Val	Val	Lys	Ser	Asn	Ser	Thr	His	Asn	
1430						1435					1440				
Ala	Ser	Asp	Ala	Val	Tyr	Lys	Ala	Gln	Leu	Tyr	Leu	Thr	Pro	Tyr	
1445						1450					1455				
Gly	Pro	Lys	Gln	Tyr	Val	Glu	His	Leu	Asn	Gln	Asn	Thr	Gly	Asn	
1460						1465					1470				
Thr	Thr	Asp	Ala	Ile	Asn	Ile	Tyr	Phe	Val	Pro	Ser	Asp	Leu	Val	
1475						1480					1485				
Asn	Pro	Thr	Ile	Ser	Val	Gly	Asn	Tyr	Thr	Asn	His	Gln	Val	Phe	
1490						1495					1500				
Ser	Gly	Glu	Thr	Phe	Thr	Asn	Thr	Ile	Thr	Ala	Asn	Asp	Asn	Phe	
1505						1510					1515				
Gly	Val	Gln	Ser	Val	Thr	Val	Pro	Asn	Thr	Ser	Gln	Ile	Thr	Gly	
1520						1525					1530				
Thr	Val	Asp	Asn	Asn	His	Gln	His	Val	Ser	Ala	Thr	Ala	Pro	Asn	
1535						1540					1545				
Val	Thr	Ser	Ala	Thr	Asn	Lys	Thr	Ile	Asn	Leu	Leu	Ala	Thr	Asp	
1550						1555					1560				
Thr	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Thr	Thr	Ser	Phe	Asn	Val	Thr	Val	Lys	
1565						1570					1575				
Pro	Leu	Arg	Asp	Lys	Tyr	Arg	Val	Gly	Thr	Ser	Ser	Thr	Ala	Ala	
1580						1585					1590				
Asn	Pro	Val	Arg	Ile	Ala	Asn	Ile	Ser	Asn	Asn	Ala	Thr	Val	Ser	
1595						1600					1605				

Gln Ala	Asp Gln Thr Thr	Ile	Ile Asn Ser Leu Thr	Phe Thr Glu
1610		1615		1620
Thr Val	Pro Asn Arg Ser	Tyr	Ala Arg Ala Ser	Ala Asn Glu Ile
1625		1630		1635
Thr Ser	Lys Thr Val Ser	Asn	Val Ser Arg Thr	Gly Asn Asn Ala
1640		1645		1650
Asn Val	Thr Val Thr Val	Thr	Tyr Gln Asp Gly	Thr Thr Ser Thr
1655		1660		1665
Val Thr	Val Pro Val Lys	His	Val Ile Pro Glu	Ile Val Ala His
1670		1675		1680
Ser His	Tyr Thr Val Gln	Gly	Gln Asp Phe Pro	Ala Gly Asn Gly
1685		1690		1695
Ser Ser	Ala Ser Asp Tyr	Phe	Lys Leu Ser Asn	Gly Ser Asp Ile
1700		1705		1710
Ala Asp	Ala Thr Ile Thr	Trp	Val Ser Gly Gln	Ala Pro Asn Lys
1715		1720		1725
Asp Asn	Thr Arg Ile Gly	Glu	Asp Ile Thr Val	Thr Ala His Ile
1730		1735		1740
Leu Ile	Asp Gly Glu Thr	Thr	Pro Ile Thr Lys	Thr Ala Thr Tyr
1745		1750		1755
Lys Val	Val Arg Thr Val	Pro	Lys His Val Phe	Glu Thr Ala Arg
1760		1765		1770
Gly Val	Leu Tyr Pro Gly	Val	Ser Asp Met Tyr	Asp Ala Lys Gln
1775		1780		1785
Tyr Val	Lys Pro Val Asn	Asn	Ser Trp Ser Thr	Asn Ala Gln His
1790		1795		1800
Met Asn	Phe Gln Phe Val	Gly	Thr Tyr Gly Pro	Asn Lys Asp Val
1805		1810		1815
Val Gly	Ile Ser Thr Arg	Leu	Ile Arg Val Thr	Tyr Asp Asn Arg
1820		1825		1830
Gln Thr	Glu Asp Leu Thr	Ile	Leu Ser Lys Val	Lys Pro Asp Pro
1835		1840		1845

Pro	Arg	Ile	Asp	Ala	Asn	Ser	Val	Thr	Tyr	Lys	Ala	Gly	Leu	Thr
	1850					1855					1860			
Asn	Gln	Glu	Ile	Lys	Val	Asn	Asn	Val	Leu	Asn	Asn	Ser	Ser	Val
	1865					1870					1875			
Lys	Leu	Phe	Lys	Ala	Asp	Asn	Thr	Pro	Leu	Asn	Val	Thr	Asn	Ile
	1880					1885					1890			
Thr	His	Gly	Ser	Gly	Phe	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Ser	Asp	Ala
	1895					1900					1905			
Leu	Pro	Asn	Gly	Gly	Ile	Lys	Ala	Lys	Ser	Ser	Ile	Ser	Met	Asn
	1910					1915					1920			
Asn	Val	Thr	Tyr	Thr	Thr	Gln	Asp	Glu	His	Gly	Gln	Val	Val	Thr
	1925					1930					1935			
Val	Thr	Arg	Asn	Glu	Ser	Val	Asp	Ser	Asn	Asp	Ser	Ala	Thr	Val
	1940					1945					1950			
Thr	Val	Thr	Pro	Gln	Leu	Gln	Ala	Thr	Thr	Glu	Gly	Ala	Val	Phe
	1955					1960					1965			
Ile	Lys	Gly	Gly	Asp	Gly	Phe	Asp	Phe	Gly	His	Val	Glu	Arg	Phe
	1970					1975					1980			
Ile	Gln	Asn	Pro	Pro	His	Gly	Ala	Thr	Val	Ala	Trp	His	Asp	Ser
	1985					1990					1995			
Pro	Asp	Thr	Trp	Lys	Asn	Thr	Val	Gly	Asn	Thr	His	Lys	Thr	Ala
	2000					2005					2010			
Val	Val	Thr	Leu	Pro	Asn	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Asn	Val	Glu	Val
	2015					2020					2025			
Pro	Val	Lys	Val	Tyr	Pro	Val	Ala	Asn	Ala	Lys	Ala	Pro	Ser	Arg
	2030					2035					2040			
Asp	Val	Lys	Gly	Gln	Asn	Leu	Thr	Asn	Gly	Thr	Asp	Ala	Met	Asn
	2045					2050					2055			
Tyr	Ile	Thr	Phe	Asp	Pro	Asn	Thr	Asn	Thr	Asn	Gly	Ile	Thr	Ala
	2060					2065					2070			
Ala	Trp	Ala	Asn	Arg	Gln	Gln	Pro	Asn	Asn	Gln	Gln	Ala	Gly	Val
	2075					2080					2085			

Gln	His	Leu	Asn	Val	Asp	Val	Thr	Tyr	Pro	Gly	Ile	Ser	Ala	Ala
2090						2095					2100			
Lys	Arg	Val	Pro	Val	Thr	Val	Asn	Val	Tyr	Gln	Phe	Glu	Phe	Pro
2105						2110					2115			
Gln	Thr	Thr	Tyr	Thr	Thr	Thr	Val	Gly	Gly	Thr	Leu	Ala	Ser	Gly
2120						2125					2130			
Thr	Gln	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	His	Met	Gln	Asn	Ala	Thr	Gly	Leu
2135						2140					2145			
Pro	Thr	Asp	Gly	Phe	Thr	Tyr	Lys	Trp	Asn	Arg	Asp	Thr	Thr	Gly
2150						2155					2160			
Thr	Asn	Asp	Ala	Asn	Trp	Ser	Ala	Met	Asn	Lys	Pro	Asn	Val	Ala
2165						2170					2175			
Lys	Val	Val	Asn	Ala	Lys	Tyr	Asp	Val	Ile	Tyr	Asn	Gly	His	Thr
2180						2185					2190			
Phe	Ala	Thr	Ser	Leu	Pro	Ala	Lys	Phe	Val	Val	Lys	Asp	Val	Gln
2195						2200					2205			
Pro	Ala	Lys	Pro	Thr	Val	Thr	Glu	Thr	Ala	Ala	Gly	Ala	Ile	Thr
2210						2215					2220			
Ile	Ala	Pro	Gly	Ala	Asn	Gln	Thr	Val	Asn	Thr	His	Ala	Gly	Asn
2225						2230					2235			
Val	Thr	Thr	Tyr	Ala	Asp	Lys	Leu	Val	Ile	Lys	Arg	Asn	Gly	Asn
2240						2245					2250			
Val	Val	Thr	Thr	Phe	Thr	Arg	Arg	Asn	Asn	Thr	Ser	Pro	Trp	Val
2255						2260					2265			
Lys	Glu	Ala	Ser	Ala	Ala	Thr	Val	Ala	Gly	Ile	Ala	Gly	Thr	Asn
2270						2275					2280			
Asn	Gly	Ile	Thr	Val	Ala	Ala	Gly	Thr	Phe	Asn	Pro	Ala	Asp	Thr
2285						2290					2295			
Ile	Gln	Val	Val	Ala	Thr	Gln	Gly	Ser	Gly	Glu	Thr	Val	Ser	Asp
2300						2305					2310			
Glu	Gln	Arg	Ser	Asp	Asp	Phe	Thr	Val	Val	Ala	Pro	Gln	Pro	Asn

ES 2 655 701 T3

2315		2320		2325
Gln Ala Thr Thr Lys Ile Trp	Gln Asn Gly His Ile Asp Ile Thr			
2330	2335	2340		
Pro Asn Asn Pro Ser Gly His	Leu Ile Asn Pro Thr Gln Ala Met			
2345	2350	2355		
Asp Ile Ala Tyr Thr Glu Lys	Val Gly Asn Gly Ala Glu His Ser			
2360	2365	2370		
Lys Thr Ile Asn Val Val Arg	Gly Gln Asn Asn Gln Trp Thr Ile			
2375	2380	2385		
Ala Asn Lys Pro Asp Tyr Val	Thr Leu Asp Ala Gln Thr Gly Lys			
2390	2395	2400		
Val Thr Phe Asn Ala Asn Thr	Ile Lys Pro Asn Ser Ser Ile Thr			
2405	2410	2415		
Ile Thr Pro Lys Ala Gly Thr	Gly His Ser Val Ser Ser Asn Pro			
2420	2425	2430		
Ser Thr Leu Thr Ala Pro Ala	Ala His Thr Val Asn Thr Thr Glu			
2435	2440	2445		
Ile Val Lys Asp Tyr Gly Ser	Asn Val Thr Ala Ala Glu Ile Asn			
2450	2455	2460		
Asn Ala Val Gln Val Ala Asn	Lys Arg Thr Ala Thr Ile Lys Asn			
2465	2470	2475		
Gly Thr Ala Met Pro Thr Asn	Leu Ala Gly Gly Ser Thr Thr Thr			
2480	2485	2490		
Ile Pro Val Thr Val Thr Tyr	Asn Asp Gly Ser Thr Glu Glu Val			
2495	2500	2505		
Gln Glu Ser Ile Phe Thr Lys	Ala Asp Lys Arg Glu Leu Ile Thr			
2510	2515	2520		
Ala Lys Asn His Leu Asp Asp	Pro Val Ser Thr Glu Gly Lys Lys			
2525	2530	2535		
Pro Gly Thr Ile Thr Gln Tyr	Asn Asn Ala Met His Asn Ala Gln			
2540	2545	2550		

ES 2 655 701 T3

Gln Gln 2555	Ile Asn Thr Ala Lys 2560	Thr Glu Ala Gln Gln 2565	Val Ile Asn
Asn Glu 2570	Arg Ala Thr Pro Gln 2575	Gln Val Ser Asp Ala 2580	Leu Thr Lys
Val Arg 2585	Ala Ala Gln Thr Lys 2590	Ile Asp Gln Ala Lys 2595	Ala Leu Leu
Gln Asn 2600	Lys Glu Asp Asn Ser 2605	Gln Leu Val Thr Ser 2610	Lys Asn Asn
Leu Gln 2615	Ser Ser Val Asn Gln 2620	Val Pro Ser Thr Ala 2625	Gly Met Thr
Gln Gln 2630	Ser Ile Asp Asn Tyr 2635	Asn Ala Lys Lys Arg 2640	Glu Ala Glu
Thr Glu 2645	Ile Thr Ala Ala Gln 2650	Arg Val Ile Asp Asn 2655	Gly Asp Ala
Thr Ala 2660	Gln Gln Ile Ser Asp 2665	Glu Lys His Arg Val 2670	Asp Asn Ala
Leu Thr 2675	Ala Leu Asn Gln Ala 2680	Lys His Asp Leu Thr 2685	Ala Asp Thr
His Ala 2690	Leu Glu Gln Ala Val 2695	Gln Gln Leu Asn Arg 2700	Thr Gly Thr
Thr Thr 2705	Gly Lys Lys Pro Ala 2710	Ser Ile Thr Ala Tyr 2715	Asn Asn Ser
Ile Arg 2720	Ala Leu Gln Ser Asp 2725	Leu Thr Ser Ala Lys 2730	Asn Ser Ala
Asn Ala 2735	Ile Ile Gln Lys Pro 2740	Ile Arg Thr Val Gln 2745	Glu Val Gln
Ser Ala 2750	Leu Thr Asn Val Asn 2755	Arg Val Asn Glu Arg 2760	Leu Thr Gln
Ala Ile 2765	Asn Gln Leu Val Pro 2770	Leu Ala Asp Asn Ser 2775	Ala Leu Lys
Thr Ala 2780	Lys Thr Lys Leu Asp 2785	Glu Glu Ile Asn Lys 2790	Ser Val Thr

ES 2 655 701 T3

Thr	Asp	Gly	Met	Thr	Gln	Ser	Ser	Ile	Gln	Ala	Tyr	Glu	Asn	Ala
2795						2800					2805			
Lys	Arg	Ala	Gly	Gln	Thr	Glu	Ser	Thr	Asn	Ala	Gln	Asn	Val	Ile
2810						2815					2820			
Asn	Asn	Gly	Asp	Ala	Thr	Asp	Gln	Gln	Ile	Ala	Ala	Glu	Lys	Thr
2825						2830					2835			
Lys	Val	Glu	Glu	Lys	Tyr	Asn	Ser	Leu	Lys	Gln	Ala	Ile	Ala	Gly
2840						2845					2850			
Leu	Thr	Pro	Asp	Leu	Ala	Pro	Leu	Gln	Thr	Ala	Lys	Thr	Gln	Leu
2855						2860					2865			
Gln	Asn	Asp	Ile	Asp	Gln	Pro	Thr	Ser	Thr	Thr	Gly	Met	Thr	Ser
2870						2875					2880			
Ala	Ser	Ile	Ala	Ala	Phe	Asn	Glu	Lys	Leu	Ser	Ala	Ala	Arg	Thr
2885						2890					2895			
Lys	Ile	Gln	Glu	Ile	Asp	Arg	Val	Leu	Ala	Ser	His	Pro	Asp	Val
2900						2905					2910			
Ala	Thr	Ile	Arg	Gln	Asn	Val	Thr	Ala	Ala	Asn	Ala	Ala	Lys	Ser
2915						2920					2925			
Ala	Leu	Asp	Gln	Ala	Arg	Asn	Gly	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ala	Pro
2930						2935					2940			
Leu	Glu	Asn	Ala	Lys	Asn	Gln	Leu	Gln	His	Ser	Ile	Asp	Thr	Gln
2945						2950					2955			
Thr	Ser	Thr	Thr	Gly	Met	Thr	Gln	Asp	Ser	Ile	Asn	Ala	Tyr	Asn
2960						2965					2970			
Ala	Lys	Leu	Thr	Ala	Ala	Arg	Asn	Lys	Ile	Gln	Gln	Ile	Asn	Gln
2975						2980					2985			
Val	Leu	Ala	Gly	Ser	Pro	Thr	Val	Glu	Gln	Ile	Asn	Thr	Asn	Thr
2990						2995					3000			
Ser	Thr	Ala	Asn	Gln	Ala	Lys	Ser	Asp	Leu	Asp	His	Ala	Arg	Gln
3005						3010					3015			
Ala	Leu	Thr	Pro	Asp	Lys	Ala	Pro	Leu	Gln	Thr	Ala	Lys	Thr	Gln
3020						3025					3030			

ES 2 655 701 T3

Leu	Glu	Gln	Ser	Ile	Asn	Gln	Pro	Thr	Asp	Thr	Thr	Gly	Met	Thr
	3035					3040					3045			
Thr	Ala	Ser	Leu	Asn	Ala	Tyr	Asn	Gln	Lys	Leu	Gln	Ala	Ala	Arg
	3050					3055					3060			
Gln	Lys	Leu	Thr	Glu	Ile	Asn	Gln	Val	Leu	Asn	Gly	Asn	Pro	Thr
	3065					3070					3075			
Val	Gln	Asn	Ile	Asn	Asp	Lys	Val	Thr	Glu	Ala	Asn	Gln	Ala	Lys
	3080					3085					3090			
Asp	Gln	Leu	Asn	Thr	Ala	Arg	Gln	Gly	Leu	Thr	Leu	Asp	Arg	Gln
	3095					3100					3105			
Pro	Ala	Leu	Thr	Thr	Leu	His	Gly	Ala	Ser	Asn	Leu	Asn	Gln	Ala
	3110					3115					3120			
Gln	Gln	Asn	Asn	Phe	Thr	Gln	Gln	Ile	Asn	Ala	Ala	Gln	Asn	His
	3125					3130					3135			
Ala	Ala	Leu	Glu	Thr	Ile	Lys	Ser	Asn	Ile	Thr	Ala	Leu	Asn	Thr
	3140					3145					3150			
Ala	Met	Thr	Lys	Leu	Lys	Asp	Ser	Val	Ala	Asp	Asn	Asn	Thr	Ile
	3155					3160					3165			
Lys	Ser	Asp	Gln	Asn	Tyr	Thr	Asp	Ala	Thr	Pro	Ala	Asn	Lys	Gln
	3170					3175					3180			
Ala	Tyr	Asp	Asn	Ala	Val	Asn	Ala	Ala	Lys	Gly	Val	Ile	Gly	Glu
	3185					3190					3195			
Thr	Thr	Asn	Pro	Thr	Met	Asp	Val	Asn	Thr	Val	Asn	Gln	Lys	Ala
	3200					3205					3210			
Ala	Ser	Val	Lys	Ser	Thr	Lys	Asp	Ala	Leu	Asp	Gly	Gln	Gln	Asn
	3215					3220					3225			
Leu	Gln	Arg	Ala	Lys	Thr	Glu	Ala	Thr	Asn	Ala	Ile	Thr	His	Ala
	3230					3235					3240			
Ser	Asp	Leu	Asn	Gln	Ala	Gln	Lys	Asn	Ala	Leu	Thr	Gln	Gln	Val
	3245					3250					3255			
Asn	Ser	Ala	Gln	Asn	Val	Gln	Ala	Val	Asn	Asp	Ile	Lys	Gln	Thr

ES 2 655 701 T3

3260		3265		3270
Thr Gln Ser Leu Asn Thr	Ala Met Thr Gly Leu Lys	Arg Gly Val		
3275	3280	3285		
Ala Asn His Asn Gln Val	Val Gln Ser Asp Asn Tyr	Val Asn Ala		
3290	3295	3300		
Asp Thr Asn Lys Lys Asn	Asp Tyr Asn Asn Ala Tyr	Asn His Ala		
3305	3310	3315		
Asn Asp Ile Ile Asn Gly	Asn Ala Gln His Pro Val	Ile Thr Pro		
3320	3325	3330		
Ser Asp Val Asn Asn Ala	Leu Ser Asn Val Thr Ser	Lys Glu His		
3335	3340	3345		
Ala Leu Asn Gly Glu Ala	Lys Leu Asn Ala Ala Lys	Gln Glu Ala		
3350	3355	3360		
Asn Thr Ala Leu Gly His	Leu Asn Asn Leu Asn Asn	Ala Gln Arg		
3365	3370	3375		
Gln Asn Leu Gln Ser Gln	Ile Asn Gly Ala His Gln	Ile Asp Ala		
3380	3385	3390		
Val Asn Thr Ile Lys Gln	Asn Ala Thr Asn Leu Asn	Ser Ala Met		
3395	3400	3405		
Gly Asn Leu Arg Gln Ala	Val Ala Asp Lys Asp Gln	Val Lys Arg		
3410	3415	3420		
Thr Glu Asp Tyr Ala Asp	Ala Asp Thr Ala Lys Gln	Asn Ala Tyr		
3425	3430	3435		
Asn Ser Ala Val Ser Ser	Ala Glu Thr Ile Ile Asn	Gln Thr Thr		
3440	3445	3450		
Asn Pro Thr Met Ser Val	Asp Asp Val Asn Arg Ala	Thr Ser Ala		
3455	3460	3465		
Val Thr Ser Asn Lys Asn	Ala Leu Asn Gly Tyr Glu	Lys Leu Ala		
3470	3475	3480		
Gln Ser Lys Thr Asp Ala	Ala Arg Ala Ile Asp Ala	Leu Pro His		
3485	3490	3495		

ES 2 655 701 T3

Leu	Asn	Asn	Ala	Gln	Lys	Ala	Asp	Val	Lys	Ser	Lys	Ile	Asn	Ala
3500						3505					3510			
Ala	Ser	Asn	Ile	Ala	Gly	Val	Asn	Thr	Val	Lys	Gln	Gln	Gly	Thr
3515						3520					3525			
Asp	Leu	Asn	Thr	Ala	Met	Gly	Asn	Leu	Gln	Gly	Ala	Ile	Asn	Asp
3530						3535					3540			
Glu	Gln	Thr	Thr	Leu	Asn	Ser	Gln	Asn	Tyr	Gln	Asp	Ala	Thr	Pro
3545						3550					3555			
Ser	Lys	Lys	Thr	Ala	Tyr	Thr	Asn	Ala	Val	Gln	Ala	Ala	Lys	Asp
3560						3565					3570			
Ile	Leu	Asn	Lys	Ser	Asn	Gly	Gln	Asn	Lys	Thr	Lys	Asp	Gln	Val
3575						3580					3585			
Thr	Glu	Ala	Met	Asn	Gln	Val	Asn	Ser	Ala	Lys	Asn	Asn	Leu	Asp
3590						3595					3600			
Gly	Thr	Arg	Leu	Leu	Asp	Gln	Ala	Lys	Gln	Thr	Ala	Lys	Gln	Gln
3605						3610					3615			
Leu	Asn	Asn	Met	Thr	His	Leu	Thr	Thr	Ala	Gln	Lys	Thr	Asn	Leu
3620						3625					3630			
Thr	Asn	Gln	Ile	Asn	Ser	Gly	Thr	Thr	Val	Ala	Gly	Val	Gln	Thr
3635						3640					3645			
Val	Gln	Ser	Asn	Ala	Asn	Thr	Leu	Asp	Gln	Ala	Met	Asn	Thr	Leu
3650						3655					3660			
Arg	Gln	Ser	Ile	Ala	Asn	Lys	Asp	Ala	Thr	Lys	Ala	Ser	Glu	Asp
3665						3670					3675			
Tyr	Val	Asp	Ala	Asn	Asn	Asp	Lys	Gln	Thr	Ala	Tyr	Asn	Asn	Ala
3680						3685					3690			
Val	Ala	Ala	Ala	Glu	Thr	Ile	Ile	Asn	Ala	Asn	Ser	Asn	Pro	Glu
3695						3700					3705			
Met	Asn	Pro	Ser	Thr	Ile	Thr	Gln	Lys	Ala	Glu	Gln	Val	Asn	Ser
3710						3715					3720			
Ser	Lys	Thr	Ala	Leu	Asn	Gly	Asp	Glu	Asn	Leu	Ala	Ala	Ala	Lys
3725						3730					3735			

ES 2 655 701 T3

Gln	Asn	Ala	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn	Thr	Leu	Thr	Ser	Ile	Thr	Asp
3740						3745					3750			
Ala	Gln	Lys	Asn	Asn	Leu	Ile	Ser	Gln	Ile	Thr	Ser	Ala	Thr	Arg
3755						3760					3765			
Val	Ser	Gly	Val	Asp	Thr	Val	Lys	Gln	Asn	Ala	Gln	His	Leu	Asp
3770						3775					3780			
Gln	Ala	Met	Ala	Ser	Leu	Gln	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Glu	Ser	Gln
3785						3790					3795			
Val	Lys	Ser	Ser	Glu	Lys	Tyr	Arg	Asp	Ala	Asp	Thr	Asn	Lys	Gln
3800						3805					3810			
Gln	Glu	Tyr	Asp	Asn	Ala	Ile	Thr	Ala	Ala	Lys	Ala	Ile	Leu	Asn
3815						3820					3825			
Lys	Ser	Thr	Gly	Pro	Asn	Thr	Ala	Gln	Asn	Ala	Val	Glu	Ala	Ala
3830						3835					3840			
Leu	Gln	Arg	Val	Asn	Asn	Ala	Lys	Asp	Ala	Leu	Asn	Gly	Asp	Ala
3845						3850					3855			
Lys	Leu	Ile	Ala	Ala	Gln	Asn	Ala	Ala	Lys	Gln	His	Leu	Gly	Thr
3860						3865					3870			
Leu	Thr	His	Ile	Thr	Thr	Ala	Gln	Arg	Asn	Asp	Leu	Thr	Asn	Gln
3875						3880					3885			
Ile	Ser	Gln	Ala	Thr	Asn	Leu	Ala	Gly	Val	Glu	Ser	Val	Lys	Gln
3890						3895					3900			
Asn	Ala	Asn	Ser	Leu	Asp	Gly	Ala	Met	Gly	Asn	Leu	Gln	Thr	Ala
3905						3910					3915			
Ile	Asn	Asp	Lys	Ser	Gly	Thr	Leu	Ala	Ser	Gln	Asn	Phe	Leu	Asp
3920						3925					3930			
Ala	Asp	Glu	Gln	Lys	Arg	Asn	Ala	Tyr	Asn	Gln	Ala	Val	Ser	Ala
3935						3940					3945			
Ala	Glu	Thr	Ile	Leu	Asn	Lys	Gln	Thr	Gly	Pro	Asn	Thr	Ala	Lys
3950						3955					3960			
Thr	Ala	Val	Glu	Gln	Ala	Leu	Asn	Asn	Val	Asn	Asn	Ala	Lys	His
3965						3970					3975			

ES 2 655 701 T3

Ala	Leu	Asn	Gly	Thr	Gln	Asn	Leu	Asn	Asn	Ala	Lys	Gln	Ala	Ala
3980						3985					3990			
Ile	Thr	Ala	Ile	Asn	Gly	Ala	Ser	Asp	Leu	Asn	Gln	Lys	Gln	Lys
3995						4000					4005			
Asp	Ala	Leu	Lys	Ala	Gln	Ala	Asn	Gly	Ala	Gln	Arg	Val	Ser	Asn
4010						4015					4020			
Ala	Gln	Asp	Val	Gln	His	Asn	Ala	Thr	Glu	Leu	Asn	Thr	Ala	Met
4025						4030					4035			
Gly	Thr	Leu	Lys	His	Ala	Ile	Ala	Asp	Lys	Thr	Asn	Thr	Leu	Ala
4040						4045					4050			
Ser	Ser	Lys	Tyr	Val	Asn	Ala	Asp	Ser	Thr	Lys	Gln	Asn	Ala	Tyr
4055						4060					4065			
Thr	Thr	Lys	Val	Thr	Asn	Ala	Glu	His	Ile	Ile	Ser	Gly	Thr	Pro
4070						4075					4080			
Thr	Val	Val	Thr	Thr	Pro	Ser	Glu	Val	Thr	Ala	Ala	Ala	Asn	Gln
4085						4090					4095			
Val	Asn	Ser	Ala	Lys	Gln	Glu	Leu	Asn	Gly	Asp	Glu	Arg	Leu	Arg
4100						4105					4110			
Glu	Ala	Lys	Gln	Asn	Ala	Asn	Thr	Ala	Ile	Asp	Ala	Leu	Thr	Gln
4115						4120					4125			
Leu	Asn	Thr	Pro	Gln	Lys	Ala	Lys	Leu	Lys	Glu	Gln	Val	Gly	Gln
4130						4135					4140			
Ala	Asn	Arg	Leu	Glu	Asp	Val	Gln	Thr	Val	Gln	Thr	Asn	Gly	Gln
4145						4150					4155			
Ala	Leu	Asn	Asn	Ala	Met	Lys	Gly	Leu	Arg	Asp	Ser	Ile	Ala	Asn
4160						4165					4170			
Glu	Thr	Thr	Val	Lys	Thr	Ser	Gln	Asn	Tyr	Thr	Asp	Ala	Ser	Pro
4175						4180					4185			
Asn	Asn	Gln	Ser	Thr	Tyr	Asn	Ser	Ala	Val	Ser	Asn	Ala	Lys	Gly
4190						4195					4200			
Ile	Ile	Asn	Gln	Thr	Asn	Asn	Pro	Thr	Met	Asp	Thr	Ser	Ala	Ile

ES 2 655 701 T3

4205						4210						4215
Thr Gln Ala Thr Thr Gln Val Asn Asn Ala Lys Asn Gly Leu Asn	4220					4225						4230
Gly Ala Glu Asn Leu Arg Asn Ala Gln Asn Thr Ala Lys Gln Asn	4235					4240						4245
Leu Asn Thr Leu Ser His Leu Thr Asn Asn Gln Lys Ser Ala Ile	4250					4255						4260
Ser Ser Gln Ile Asp Arg Ala Gly His Val Ser Glu Val Thr Ala	4265					4270						4275
Thr Lys Asn Ala Ala Thr Glu Leu Asn Thr Gln Met Gly Asn Leu	4280					4285						4290
Glu Gln Ala Ile His Asp Gln Asn Thr Val Lys Gln Ser Val Lys	4295					4300						4305
Phe Thr Asp Ala Asp Lys Ala Lys Arg Asp Ala Tyr Thr Asn Ala	4310					4315						4320
Val Ser Arg Ala Glu Ala Ile Leu Asn Lys Thr Gln Gly Ala Asn	4325					4330						4335
Thr Ser Lys Gln Asp Val Glu Ala Ala Ile Gln Asn Val Ser Ser	4340					4345						4350
Ala Lys Asn Ala Leu Asn Gly Asp Gln Asn Val Thr Asn Ala Lys	4355					4360						4365
Asn Ala Ala Lys Asn Ala Leu Asn Asn Leu Thr Ser Ile Asn Asn	4370					4375						4380
Ala Gln Lys Arg Asp Leu Thr Thr Lys Ile Asp Gln Ala Thr Thr	4385					4390						4395
Val Ala Gly Val Glu Ala Val Ser Asn Thr Ser Thr Gln Leu Asn	4400					4405						4410
Thr Ala Met Ala Asn Leu Gln Asn Gly Ile Asn Asp Lys Thr Asn	4415					4420						4425
Thr Leu Ala Ser Glu Asn Tyr His Asp Ala Asp Ser Asp Lys Lys	4430					4435						4440

Thr	Ala	Tyr	Thr	Gln	Ala	Val	Thr	Asn	Ala	Glu	Asn	Ile	Leu	Asn
4445						4450					4455			
Lys	Asn	Ser	Gly	Ser	Asn	Leu	Asp	Lys	Thr	Ala	Val	Glu	Asn	Ala
4460						4465					4470			
Leu	Ser	Gln	Val	Ala	Asn	Ala	Lys	Gly	Ala	Leu	Asn	Gly	Asn	His
4475						4480					4485			
Asn	Leu	Glu	Gln	Ala	Lys	Ser	Asn	Ala	Asn	Thr	Thr	Ile	Asn	Gly
4490						4495					4500			
Leu	Gln	His	Leu	Thr	Thr	Ala	Gln	Lys	Asp	Lys	Leu	Lys	Gln	Gln
4505						4510					4515			
Val	Gln	Gln	Ala	Gln	Asn	Val	Ala	Gly	Val	Asp	Thr	Val	Lys	Ser
4520						4525					4530			
Ser	Ala	Asn	Thr	Leu	Asn	Gly	Ala	Met	Gly	Thr	Leu	Arg	Asn	Ser
4535						4540					4545			
Ile	Gln	Asp	Asn	Thr	Ala	Thr	Lys	Asn	Gly	Gln	Asn	Tyr	Leu	Asp
4550						4555					4560			
Ala	Thr	Glu	Arg	Asn	Lys	Thr	Asn	Tyr	Asn	Asn	Ala	Val	Asp	Ser
4565						4570					4575			
Ala	Asn	Gly	Val	Ile	Asn	Ala	Thr	Ser	Asn	Pro	Asn	Met	Asp	Ala
4580						4585					4590			
Asn	Ala	Ile	Asn	Gln	Ile	Ala	Thr	Gln	Val	Thr	Ser	Thr	Lys	Asn
4595						4600					4605			
Ala	Leu	Asp	Gly	Thr	His	Asn	Leu	Thr	Gln	Ala	Lys	Gln	Thr	Ala
4610						4615					4620			
Thr	Asn	Ala	Ile	Asp	Gly	Ala	Thr	Asn	Leu	Asn	Lys	Ala	Gln	Lys
4625						4630					4635			
Asp	Ala	Leu	Lys	Ala	Gln	Val	Thr	Ser	Ala	Gln	Arg	Val	Ala	Asn
4640						4645					4650			
Val	Thr	Ser	Ile	Gln	Gln	Thr	Ala	Asn	Glu	Leu	Asn	Thr	Ala	Met
4655						4660					4665			
Gly	Gln	Leu	Gln	His	Gly	Ile	Asp	Asp	Glu	Asn	Ala	Thr	Lys	Gln
4670						4675					4680			

Thr	Gln	Lys	Tyr	Arg	Asp	Ala	Glu	Gln	Ser	Lys	Lys	Thr	Ala	Tyr
4685						4690					4695			
Asp	Gln	Ala	Val	Ala	Ala	Ala	Lys	Ala	Ile	Leu	Asn	Lys	Gln	Thr
4700						4705					4710			
Gly	Ser	Asn	Ser	Asp	Lys	Ala	Ala	Val	Asp	Arg	Ala	Leu	Gln	Gln
4715						4720					4725			
Val	Thr	Ser	Thr	Lys	Asp	Ala	Leu	Asn	Gly	Asp	Ala	Lys	Leu	Ala
4730						4735					4740			
Glu	Ala	Lys	Ala	Ala	Ala	Lys	Gln	Asn	Leu	Gly	Thr	Leu	Asn	His
4745						4750					4755			
Ile	Thr	Asn	Ala	Gln	Arg	Thr	Asp	Leu	Glu	Gly	Gln	Ile	Asn	Gln
4760						4765					4770			
Ala	Thr	Thr	Val	Asp	Gly	Val	Asn	Thr	Val	Lys	Thr	Asn	Ala	Asn
4775						4780					4785			
Thr	Leu	Asp	Gly	Ala	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Gly	Ser	Ile	Asn	Asp
4790						4795					4800			
Lys	Asp	Ala	Thr	Leu	Arg	Asn	Gln	Asn	Tyr	Leu	Asp	Ala	Asp	Glu
4805						4810					4815			
Ser	Lys	Arg	Asn	Ala	Tyr	Thr	Gln	Ala	Val	Thr	Ala	Ala	Glu	Gly
4820						4825					4830			
Ile	Leu	Asn	Lys	Gln	Thr	Gly	Gly	Asn	Thr	Ser	Lys	Ala	Asp	Val
4835						4840					4845			
Asp	Asn	Ala	Leu	Asn	Ala	Val	Thr	Arg	Ala	Lys	Ala	Ala	Leu	Asn
4850						4855					4860			
Gly	Ala	Asp	Asn	Leu	Arg	Asn	Ala	Lys	Thr	Ser	Ala	Thr	Asn	Thr
4865						4870					4875			
Ile	Asp	Gly	Leu	Pro	Asn	Leu	Thr	Gln	Leu	Gln	Lys	Asp	Asn	Leu
4880						4885					4890			
Lys	His	Gln	Val	Glu	Gln	Ala	Gln	Asn	Val	Ala	Gly	Val	Asn	Gly
4895						4900					4905			
Val	Lys	Asp	Lys	Gly	Asn	Thr	Leu	Asn	Thr	Ala	Met	Gly	Ala	Leu
4910						4915					4920			

ES 2 655 701 T3

Arg	Thr	Ser	Ile	Gln	Asn	Asp	Asn	Thr	Thr	Lys	Thr	Ser	Gln	Asn
	4925					4930					4935			
Tyr	Leu	Asp	Ala	Ser	Asp	Ser	Asn	Lys	Asn	Asn	Tyr	Asn	Thr	Ala
	4940					4945					4950			
Val	Asn	Asn	Ala	Asn	Gly	Val	Ile	Asn	Ala	Thr	Asn	Asn	Pro	Asn
	4955					4960					4965			
Met	Asp	Ala	Asn	Ala	Ile	Asn	Gly	Met	Ala	Asn	Gln	Val	Asn	Thr
	4970					4975					4980			
Thr	Lys	Ala	Ala	Leu	Asn	Gly	Ala	Gln	Asn	Leu	Ala	Gln	Ala	Lys
	4985					4990					4995			
Thr	Asn	Ala	Thr	Asn	Thr	Ile	Asn	Asn	Ala	His	Asp	Leu	Asn	Gln
	5000					5005					5010			
Lys	Gln	Lys	Asp	Ala	Leu	Lys	Thr	Gln	Val	Asn	Asn	Ala	Gln	Arg
	5015					5020					5025			
Val	Ser	Asp	Ala	Asn	Asn	Val	Gln	His	Thr	Ala	Thr	Glu	Leu	Asn
	5030					5035					5040			
Ser	Ala	Met	Thr	Ala	Leu	Lys	Ala	Ala	Ile	Ala	Asp	Lys	Glu	Arg
	5045					5050					5055			
Thr	Lys	Ala	Ser	Gly	Asn	Tyr	Val	Asn	Ala	Asp	Gln	Glu	Lys	Arg
	5060					5065					5070			
Gln	Ala	Tyr	Asp	Ser	Lys	Val	Thr	Asn	Ala	Glu	Asn	Ile	Ile	Ser
	5075					5080					5085			
Gly	Thr	Pro	Asn	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asn	Asp	Val	Asn	Ser	Ala
	5090					5095					5100			
Ala	Ser	Gln	Val	Asn	Ala	Ala	Lys	Thr	Ala	Leu	Asn	Gly	Asp	Asn
	5105					5110					5115			
Asn	Leu	Arg	Val	Ala	Lys	Glu	His	Ala	Asn	Asn	Thr	Ile	Asp	Gly
	5120					5125					5130			
Leu	Ala	Gln	Leu	Asn	Asn	Ala	Gln	Lys	Ala	Lys	Leu	Lys	Glu	Gln
	5135					5140					5145			
Val	Gln	Ser	Ala	Thr	Thr	Leu	Asp	Gly	Val	Gln	Thr	Val	Lys	Asn

ES 2 655 701 T3

5150						5155						5160			
Ser	Ser	Gln	Thr	Leu	Asn	Thr	Ala	Met	Lys	Gly	Leu	Arg	Asp	Ser	
5165						5170					5175				
Ile	Ala	Asn	Glu	Ala	Thr	Ile	Lys	Ala	Gly	Gln	Asn	Tyr	Thr	Asp	
5180						5185					5190				
Ala	Ser	Pro	Asn	Asn	Arg	Asn	Glu	Tyr	Asp	Ser	Ala	Val	Thr	Ala	
5195						5200					5205				
Ala	Lys	Ala	Ile	Ile	Asn	Gln	Thr	Ser	Asn	Pro	Thr	Met	Glu	Pro	
5210						5215					5220				
Asn	Thr	Ile	Thr	Gln	Val	Thr	Ser	Gln	Val	Thr	Thr	Lys	Glu	Gln	
5225						5230					5235				
Ala	Leu	Asn	Gly	Ala	Arg	Asn	Leu	Ala	Gln	Ala	Lys	Thr	Thr	Ala	
5240						5245					5250				
Lys	Asn	Asn	Leu	Asn	Asn	Leu	Thr	Ser	Ile	Asn	Asn	Ala	Gln	Lys	
5255						5260					5265				
Asp	Ala	Leu	Thr	Arg	Ser	Ile	Asp	Gly	Ala	Thr	Thr	Val	Ala	Gly	
5270						5275					5280				
Val	Asn	Gln	Glu	Thr	Ala	Lys	Ala	Thr	Glu	Leu	Asn	Asn	Ala	Met	
5285						5290					5295				
His	Ser	Leu	Gln	Asn	Gly	Ile	Asn	Asp	Glu	Thr	Gln	Thr	Lys	Gln	
5300						5305					5310				
Thr	Gln	Lys	Tyr	Leu	Asp	Ala	Glu	Pro	Ser	Lys	Lys	Ser	Ala	Tyr	
5315						5320					5325				
Asp	Gln	Ala	Val	Asn	Ala	Ala	Lys	Ala	Ile	Leu	Thr	Lys	Ala	Ser	
5330						5335					5340				
Gly	Gln	Asn	Val	Asp	Lys	Ala	Ala	Val	Glu	Gln	Ala	Leu	Gln	Asn	
5345						5350					5355				
Val	Asn	Ser	Thr	Lys	Thr	Ala	Leu	Asn	Gly	Asp	Ala	Lys	Leu	Asn	
5360						5365					5370				
Glu	Ala	Lys	Ala	Ala	Ala	Lys	Gln	Thr	Leu	Gly	Thr	Leu	Thr	His	
5375						5380					5385				

Ile Asn	Asn Ala Gln Arg Thr	Ala Leu Asp Asn Glu	Ile Thr Gln
5390	5395	5400	
Ala Thr	Asn Val Glu Gly Val	Asn Thr Val Lys Ala	Lys Ala Gln
5405	5410	5415	
Gln Leu	Asp Gly Ala Met Gly	Gln Leu Glu Thr Ser	Ile Arg Asp
5420	5425	5430	
Lys Asp	Thr Thr Leu Gln Ser	Gln Asn Tyr Gln Asp	Ala Asp Asp
5435	5440	5445	
Ala Lys	Arg Thr Ala Tyr Ser	Gln Ala Val Asn Ala	Ala Ala Thr
5450	5455	5460	
Ile Leu	Asn Lys Thr Ala Gly	Gly Asn Thr Pro Lys	Ala Asp Val
5465	5470	5475	
Glu Arg	Ala Met Gln Ala Val	Thr Gln Ala Asn Thr	Ala Leu Asn
5480	5485	5490	
Gly Ile	Gln Asn Leu Asp Arg	Ala Lys Gln Ala Ala	Asn Thr Ala
5495	5500	5505	
Ile Thr	Asn Ala Ser Asp Leu	Asn Thr Lys Gln Lys	Glu Ala Leu
5510	5515	5520	
Lys Ala	Gln Val Thr Ser Ala	Gly Arg Val Ser Ala	Ala Asn Gly
5525	5530	5535	
Val Glu	His Thr Ala Thr Glu	Leu Asn Thr Ala Met	Thr Ala Leu
5540	5545	5550	
Lys Arg	Ala Ile Ala Asp Lys	Ala Glu Thr Lys Ala	Ser Gly Asn
5555	5560	5565	
Tyr Val	Asn Ala Asp Ala Asn	Lys Arg Gln Ala Tyr	Asp Glu Lys
5570	5575	5580	
Val Thr	Ala Ala Glu Asn Ile	Val Ser Gly Thr Pro	Thr Pro Thr
5585	5590	5595	
Leu Thr	Pro Ala Asp Val Thr	Asn Ala Ala Thr Gln	Val Thr Asn
5600	5605	5610	
Ala Lys	Thr Gln Leu Asn Gly	Asn His Asn Leu Glu	Val Ala Lys
5615	5620	5625	

Gln	Asn	Ala	Asn	Thr	Ala	Ile	Asp	Gly	Leu	Thr	Ser	Leu	Asn	Gly
5630						5635					5640			
Pro	Gln	Lys	Ala	Lys	Leu	Lys	Glu	Gln	Val	Gly	Gln	Ala	Thr	Thr
5645						5650					5655			
Leu	Pro	Asn	Val	Gln	Thr	Val	Arg	Asp	Asn	Ala	Gln	Thr	Leu	Asn
5660						5665					5670			
Thr	Ala	Met	Lys	Gly	Leu	Arg	Asp	Ser	Ile	Ala	Asn	Glu	Ala	Thr
5675						5680					5685			
Ile	Lys	Ala	Gly	Gln	Asn	Tyr	Thr	Asp	Ala	Ser	Gln	Asn	Lys	Gln
5690						5695					5700			
Thr	Asp	Tyr	Asn	Ser	Ala	Val	Thr	Ala	Ala	Lys	Ala	Ile	Ile	Gly
5705						5710					5715			
Gln	Thr	Thr	Ser	Pro	Ser	Met	Asn	Ala	Gln	Glu	Ile	Asn	Gln	Ala
5720						5725					5730			
Lys	Asp	Gln	Val	Thr	Ala	Lys	Gln	Gln	Ala	Leu	Asn	Gly	Gln	Glu
5735						5740					5745			
Asn	Leu	Arg	Thr	Ala	Gln	Thr	Asn	Ala	Lys	Gln	His	Leu	Asn	Gly
5750						5755					5760			
Leu	Ser	Asp	Leu	Thr	Asp	Ala	Gln	Lys	Asp	Ala	Val	Lys	Arg	Gln
5765						5770					5775			
Ile	Glu	Gly	Ala	Thr	His	Val	Asn	Glu	Val	Thr	Gln	Ala	Gln	Asn
5780						5785					5790			
Asn	Ala	Asp	Ala	Leu	Asn	Thr	Ala	Met	Thr	Asn	Leu	Lys	Asn	Gly
5795						5800					5805			
Ile	Gln	Asp	Gln	Asn	Thr	Ile	Lys	Gln	Gly	Val	Asn	Phe	Thr	Asp
5810						5815					5820			
Ala	Asp	Glu	Ala	Lys	Arg	Asn	Ala	Tyr	Thr	Asn	Ala	Val	Thr	Gln
5825						5830					5835			
Ala	Glu	Gln	Ile	Leu	Asn	Lys	Ala	Gln	Gly	Pro	Asn	Thr	Ser	Lys
5840						5845					5850			
Asp	Gly	Val	Glu	Thr	Ala	Leu	Glu	Asn	Val	Gln	Arg	Ala	Lys	Asn
5855						5860					5865			

ES 2 655 701 T3

Glu	Leu	Asn	Gly	Asn	Gln	Asn	Val	Ala	Asn	Ala	Lys	Thr	Thr	Ala
5870						5875					5880			
Lys	Asn	Ala	Leu	Asn	Asn	Leu	Thr	Ser	Ile	Asn	Asn	Ala	Gln	Lys
5885						5890					5895			
Glu	Ala	Leu	Lys	Ser	Gln	Ile	Glu	Gly	Ala	Thr	Thr	Val	Ala	Gly
5900						5905					5910			
Val	Asn	Gln	Val	Ser	Thr	Thr	Ala	Ser	Glu	Leu	Asn	Thr	Ala	Met
5915						5920					5925			
Ser	Asn	Leu	Gln	Asn	Gly	Ile	Asn	Asp	Glu	Ala	Ala	Thr	Lys	Ala
5930						5935					5940			
Ala	Gln	Lys	Tyr	Thr	Asp	Ala	Asp	Arg	Glu	Lys	Gln	Thr	Ala	Tyr
5945						5950					5955			
Asn	Asp	Ala	Val	Thr	Ala	Ala	Lys	Thr	Leu	Leu	Asp	Lys	Thr	Ala
5960						5965					5970			
Gly	Ser	Asn	Asp	Asn	Lys	Ala	Ala	Val	Glu	Gln	Ala	Leu	Gln	Arg
5975						5980					5985			
Val	Asn	Thr	Ala	Lys	Thr	Ala	Leu	Asn	Gly	Asp	Glu	Arg	Leu	Asn
5990						5995					6000			
Glu	Ala	Lys	Asn	Thr	Ala	Lys	Gln	Gln	Val	Ala	Thr	Met	Ser	His
6005						6010					6015			
Leu	Thr	Asp	Ala	Gln	Lys	Ala	Asn	Leu	Thr	Ser	Gln	Ile	Glu	Ser
6020						6025					6030			
Gly	Thr	Thr	Val	Ala	Gly	Val	Gln	Gly	Ile	Gln	Ala	Asn	Ala	Gly
6035						6040					6045			
Thr	Leu	Asp	Gln	Ala	Met	Asn	Gln	Leu	Arg	Gln	Ser	Ile	Ala	Ser
6050						6055					6060			
Lys	Asp	Ala	Thr	Lys	Ser	Ser	Glu	Asp	Tyr	Gln	Asp	Ala	Asn	Ala
6065						6070					6075			
Asp	Leu	Gln	Asn	Ala	Tyr	Asn	Asp	Ala	Val	Thr	Asn	Ala	Glu	Gly
6080						6085					6090			
Ile	Ile	Ser	Ala	Thr	Asn	Asn	Pro	Glu	Met	Asn	Pro	Asp	Thr	Ile

Ala	Lys	Ser	Ala	Leu	Asn
		6120			
Gln	Thr	Ala	Lys	Ser	Asp
		6135			
Ala	Gln	Arg	Thr	Ala	Ala
		6150			
Leu	Ala	Ala	Val	Thr	Ala
		6165			
Thr	Ala	Met	Gly	Asn	Leu
		6180			
Thr	Lys	Arg	Ser	Val	Asn
		6195			
Gln	Ala	Tyr	Asp	Thr	Ala
		6210			
Ala	Asn	Gly	Ser	Asn	Ala
		6225			
Asn	Gln	Leu	Asn	Gln	Ala
		6240			
Val	Ala	Gln	Ala	Lys	Glu
		6255			
Ser	Asn	Leu	Asn	Asn	Ala
		6270			
Asp	Asn	Ala	Thr	Thr	Val
		6285			
Ala	Asn	Glu	Leu	Asn	Thr
		6300			
Asn	Asp	Gln	Asn	Thr	Val
		6315			
Asp	Gln	Gly	Lys	Lys	Asp
		6330			

n	Gly	Ile	Leu	Asp	Lys
		6345			
n	Val	Glu	Ala	Ala	Leu
		6360			
u	Asn	Gly	Asp	Ala	Asn
		6375			
a	Asn	Leu	Gly	Thr	Leu
		6390			
p	Leu	Thr	Ser	Gln	Ile
		6405			
n	Gly	Val	Lys	Thr	Lys
		6420			
g	Leu	Gln	Ser	Ala	Ile
		6435			
u	Asn	Tyr	Ile	Asp	Ala
		6450			
n	Ala	Ile	Thr	Gln	Ala
		6465			
a	Asn	Lys	Asp	Lys	Gln
		6480			
r	Ser	Thr	Glu	Asn	Ala
		6495			
a	Lys	Thr	Glu	Ala	Ile
		6510			
n	Thr	Pro	Gln	Lys	Thr
		6525			
n	Arg	Val	Ser	Gly	Val
		6540			
u	Asn	Asn	Ala	Met	Asp
		6555			
p	Thr	Ile	Val	Ala	Ser
		6570			

ES 2 655 701 T3

Gly	Asn	Tyr	Thr	Asn	Ala	Ser	Pro	Asp	Lys	Gln	Gly	Ala	Tyr	Thr
6575						6580					6585			
Asp	Ala	Tyr	Asn	Ala	Ala	Lys	Asn	Ile	Val	Asn	Gly	Ser	Pro	Asn
6590						6595					6600			
Val	Ile	Thr	Asn	Ala	Ala	Asp	Val	Thr	Ala	Ala	Thr	Gln	Arg	Val
6605						6610					6615			
Asn	Asn	Ala	Glu	Thr	Gly	Leu	Asn	Gly	Asp	Thr	Asn	Leu	Ala	Thr
6620						6625					6630			
Ala	Lys	Gln	Gln	Ala	Lys	Asp	Ala	Leu	Arg	Gln	Met	Thr	His	Leu
6635						6640					6645			
Ser	Asp	Ala	Gln	Lys	Gln	Ser	Ile	Thr	Gly	Gln	Ile	Asp	Ser	Ala
6650						6655					6660			
Thr	Gln	Val	Thr	Gly	Val	Gln	Ser	Val	Lys	Asp	Asn	Ala	Thr	Asn
6665						6670					6675			
Leu	Asp	Asn	Ala	Met	Asn	Gln	Leu	Arg	Asn	Ser	Ile	Ala	Asn	Lys
6680						6685					6690			
Asp	Asp	Val	Lys	Ala	Ser	Gln	Pro	Tyr	Val	Asp	Ala	Asp	Arg	Asp
6695						6700					6705			
Lys	Gln	Asn	Ala	Tyr	Asn	Thr	Ala	Val	Thr	Asn	Ala	Glu	Asn	Ile
6710						6715					6720			
Ile	Asn	Ala	Thr	Ser	Gln	Pro	Thr	Leu	Asp	Pro	Ser	Ala	Val	Thr
6725						6730					6735			
Gln	Ala	Ala	Asn	Gln	Val	Ser	Thr	Asn	Lys	Thr	Ala	Leu	Asn	Gly
6740						6745					6750			
Ala	Gln	Asn	Leu	Ala	Asn	Lys	Lys	Gln	Glu	Thr	Thr	Ala	Asn	Ile
6755						6760					6765			
Asn	Gln	Leu	Ser	His	Leu	Asn	Asn	Ala	Gln	Lys	Gln	Asp	Leu	Asn
6770						6775					6780			
Thr	Gln	Val	Thr	Asn	Ala	Pro	Asn	Ile	Ser	Thr	Val	Asn	Gln	Val
6785						6790					6795			
Lys	Thr	Lys	Ala	Glu	Gln	Leu	Asp	Gln	Ala	Met	Glu	Arg	Leu	Ile
6800						6805					6810			

ES 2 655 701 T3

Asn Gly 6815	Ile Gln Asp Lys Asp 6820	Gln Val Lys Gln Ser 6825	Val Asn Phe
Thr Asp 6830	Ala Asp Pro Glu Lys 6835	Gln Thr Ala Tyr Asn 6840	Asn Ala Val
Thr Ala 6845	Ala Glu Asn Ile Ile 6850	Asn Gln Ala Asn Gly 6855	Thr Asn Ala
Asn Gln 6860	Ser Gln Val Glu Ala 6865	Ala Leu Ser Thr Val 6870	Thr Thr Thr
Lys Gln 6875	Ala Leu Asn Gly Asp 6880	Arg Lys Val Thr Asp 6885	Ala Lys Asn
Asn Ala 6890	Asn Gln Thr Leu Ser 6895	Thr Leu Asp Asn Leu 6900	Asn Asn Ala
Gln Lys 6905	Gly Ala Val Thr Gly 6910	Asn Ile Asn Gln Ala 6915	His Thr Val
Ala Glu 6920	Val Thr Gln Ala Ile 6925	Gln Thr Ala Gln Glu 6930	Leu Asn Thr
Ala Met 6935	Gly Asn Leu Lys Asn 6940	Ser Leu Asn Asp Lys 6945	Asp Thr Thr
Leu Gly 6950	Ser Gln Asn Phe Ala 6955	Asp Ala Asp Pro Glu 6960	Lys Lys Asn
Ala Tyr 6965	Asn Glu Ala Val His 6970	Asn Ala Glu Asn Ile 6975	Leu Asn Lys
Ser Thr 6980	Gly Thr Asn Val Pro 6985	Lys Asp Gln Val Glu 6990	Ala Ala Met
Asn Gln 6995	Val Asn Ala Thr Lys 7000	Ala Ala Leu Asn Gly 7005	Thr Gln Asn
Leu Glu 7010	Lys Ala Lys Gln His 7015	Ala Asn Thr Ala Ile 7020	Asp Gly Leu
Ser His 7025	Leu Thr Asn Ala Gln 7030	Lys Glu Ala Leu Lys 7035	Gln Leu Val
Gln Gln	Ser Thr Thr Val Ala	Glu Ala Gln Gly Asn	Glu Gln Lys

ES 2 655 701 T3

7040	7045	7050
Ala Asn Asn Val Asp Ala 7055	Ala Met Asp Lys Leu 7060	Arg Gln Ser Ile 7065
Ala Asp Asn Ala Thr Thr 7070	Lys Gln Asn Gln Asn 7075	Tyr Thr Asp Ala 7080
Ser Gln Asn Lys Lys Asp 7085	Ala Tyr Asn Asn Ala 7090	Val Thr Thr Ala 7095
Gln Gly Ile Ile Asp Gln 7100	Thr Thr Ser Pro Thr 7105	Leu Asp Pro Thr 7110
Val Ile Asn Gln Ala Ala 7115	Gly Gln Val Ser Thr 7120	Thr Lys Asn Ala 7125
Leu Asn Gly Asn Glu Asn 7130	Leu Glu Ala Ala Lys 7135	Gln Gln Ala Ser 7140
Gln Ser Leu Gly Ser Leu 7145	Asp Asn Leu Asn Asn 7150	Ala Gln Lys Gln 7155
Thr Val Thr Asp Gln Ile 7160	Asn Gly Ala His Thr 7165	Val Asp Glu Ala 7170
Asn Gln Ile Lys Gln Asn 7175	Ala Gln Asn Leu Asn 7180	Thr Ala Met Gly 7185
Asn Leu Lys Gln Ala Ile 7190	Ala Asp Lys Asp Ala 7195	Thr Lys Ala Thr 7200
Val Asn Phe Thr Asp Ala 7205	Asp Gln Ala Lys Gln 7210	Gln Ala Tyr Asn 7215
Thr Ala Val Thr Asn Ala 7220	Glu Asn Ile Ser Lys 7225	Ala Asn Gly Asn 7230
Ala Thr Gln Ala Glu Val 7235	Glu Gln Ala Ile Lys 7240	Gln Val Asn Ala 7245
Ala Lys Gln Ala Leu Asn 7250	Gly Asn Ala Asn Val 7255	Gln His Ala Lys 7260
Asp Glu Ala Thr Ala Leu 7265	Ile Asn Ser Ser Asn 7270	Asp Leu Asn Gln 7275

l	Gln	Asn	Ala	Thr	Thr
		7290			
r	Ala	Gln	Glu	Leu	Asn
		7305			
e	Ala	Asp	Lys	Glu	Gln
		7320			
a	Asp	Pro	Asp	Lys	Gln
		7335			
a	Glu	Ala	Leu	Ile	Ser
		7350			
r	Glu	Ile	Thr	Ala	Ala
		7365			
p	Leu	Asn	Gly	Asn	Thr
		7380			
n	His	Ala	Ile	Asp	Gln
		7395			
p	Glu	Tyr	Ser	Lys	Gln
		7410			
l	Asn	Ala	Ile	Gln	Gln
		7425			
r	Gln	Leu	Lys	Gln	Gly
		7440			
r	Glu	Asn	Tyr	His	Asp
		7455			
p	Asn	Ala	Val	Thr	Lys
		7470			
n	Pro	Thr	Met	Asp	Pro
		7485			
l	Asn	Asp	Thr	Asn	Gln
		7500			
p	Ala	Lys	Gln	Asp	Ala
		7515			

ES 2 655 701 T3

Lys Thr	Thr Leu Gly Thr	Leu	Asp His Leu Asn	Asp	Ala Gln Lys
7520		7525		7530	
Gln Ala	Leu Thr Thr Gln Val	Glu Gln Ala Pro	Asp	Ile Ala Thr	
7535		7540	7545		
Val Asn	Asn Val Lys Gln Asn	Ala Gln Asn Leu	Asn	Asn Ala Met	
7550		7555	7560		
Thr Asn	Leu Asn Asn Ala	Leu	Gln Asp Lys Thr	Glu	Thr Leu Asn
7565		7570		7575	
Ser Ile	Asn Phe Thr Asp	Ala	Asp Gln Ala Lys	Lys	Asp Ala Tyr
7580		7585		7590	
Thr Asn	Ala Val Ser His	Ala	Glu Gly Ile Leu	Ser	Lys Ala Asn
7595		7600		7605	
Gly Ser	Asn Ala Ser Gln Thr	Glu Val Glu Gln	Ala	Met Gln Arg	
7610		7615	7620		
Val Asn	Glu Ala Lys Gln Ala	Leu Asn Gly Asn	Asp	Asn Val Gln	
7625		7630	7635		
Arg Ala	Lys Asp Ala Ala	Lys	Gln Val Ile Thr	Asn	Ala Asn Asp
7640		7645		7650	
Leu Asn	Gln Ala Gln Lys Asp	Ala Leu Lys Gln	Gln	Val Asp Ala	
7655		7660	7665		
Ala Gln	Thr Val Ala Asn Val	Asn Thr Ile Lys	Gln	Thr Ala Gln	
7670		7675	7680		
Asp Leu	Asn Gln Ala Met Thr	Gln Leu Lys Gln	Gly	Ile Ala Asp	
7685		7690	7695		
Lys Asp	Gln Thr Lys Ala Asn	Gly Asn Phe Val	Asn	Ala Asp Thr	
7700		7705	7710		
Asp Lys	Gln Asn Ala Tyr Asn	Asn Ala Val Ala	His	Ala Glu Gln	
7715		7720	7725		
Ile Ile	Ser Gly Thr Pro Asn	Ala Asn Val Asp	Pro	Gln Gln Val	
7730		7735	7740		
Ala Gln	Ala Leu Gln Gln Val	Asn Gln Ala Lys	Gly	Asp Leu Asn	
7745		7750	7755		

ES 2 655 701 T3

Gly	Asn	His	Asn	Leu	Gln	Val	Ala	Lys	Asp	Asn	Ala	Asn	Thr	Ala
7760						7765					7770			
Ile	Asp	Gln	Leu	Pro	Asn	Leu	Asn	Gln	Pro	Gln	Lys	Thr	Ala	Leu
7775						7780					7785			
Lys	Asp	Gln	Val	Ser	His	Ala	Glu	Leu	Val	Thr	Gly	Val	Asn	Ala
7790						7795					7800			
Ile	Lys	Gln	Asn	Ala	Asp	Ala	Leu	Asn	Asn	Ala	Met	Gly	Thr	Leu
7805						7810					7815			
Lys	Gln	Gln	Ile	Gln	Ala	Asn	Ser	Gln	Val	Pro	Gln	Ser	Val	Asp
7820						7825					7830			
Phe	Thr	Gln	Ala	Asp	Gln	Asp	Lys	Gln	Gln	Ala	Tyr	Asn	Asn	Ala
7835						7840					7845			
Ala	Asn	Gln	Ala	Gln	Gln	Ile	Ala	Asn	Gly	Ile	Pro	Thr	Pro	Val
7850						7855					7860			
Leu	Thr	Pro	Asp	Thr	Val	Thr	Gln	Ala	Val	Thr	Thr	Met	Asn	Gln
7865						7870					7875			
Ala	Lys	Asp	Ala	Leu	Asn	Gly	Asp	Glu	Lys	Leu	Ala	Gln	Ala	Lys
7880						7885					7890			
Gln	Glu	Ala	Leu	Ala	Asn	Leu	Asp	Thr	Leu	Arg	Asp	Leu	Asn	Gln
7895						7900					7905			
Pro	Gln	Arg	Asp	Ala	Leu	Arg	Asn	Gln	Ile	Asn	Gln	Ala	Gln	Ala
7910						7915					7920			
Leu	Ala	Thr	Val	Glu	Gln	Thr	Lys	Gln	Asn	Ala	Gln	Asn	Val	Asn
7925						7930					7935			
Thr	Ala	Met	Ser	Asn	Leu	Lys	Gln	Gly	Ile	Ala	Asn	Lys	Asp	Thr
7940						7945					7950			
Val	Lys	Ala	Ser	Glu	Asn	Tyr	His	Asp	Ala	Asp	Ala	Asp	Lys	Gln
7955						7960					7965			
Thr	Ala	Tyr	Thr	Asn	Ala	Val	Ser	Gln	Ala	Glu	Gly	Ile	Ile	Asn
7970						7975					7980			
Gln	Thr	Thr	Asn	Pro	Thr	Leu	Asn	Pro	Asp	Glu	Ile	Thr	Arg	Ala

ES 2 655 701 T3

7985	7990	7995
Leu Thr Gln Val Thr Asp 8000	Ala Lys Asn Gly Leu 8005	Asn Gly Glu Ala 8010
Lys Leu Ala Thr Glu Lys 8015	Gln Asn Ala Lys Asp 8020	Ala Val Ser Gly 8025
Met Thr His Leu Asn Asp 8030	Ala Gln Lys Gln Ala 8035	Leu Lys Gly Gln 8040
Ile Asp Gln Ser Pro Glu 8045	Ile Ala Thr Val Asn 8050	Gln Val Lys Gln 8055
Thr Ala Thr Ser Leu Asp 8060	Gln Ala Met Asp Gln 8065	Leu Ser Gln Ala 8070
Ile Asn Asp Lys Ala Gln 8075	Thr Leu Ala Asp Gly 8080	Asn Tyr Leu Asn 8085
Ala Asp Pro Asp Lys Gln 8090	Asn Ala Tyr Lys Gln 8095	Ala Val Ala Lys 8100
Ala Glu Ala Leu Leu Asn 8105	Lys Gln Ser Gly Thr 8110	Asn Glu Val Gln 8115
Ala Gln Val Glu Ser Ile 8120	Thr Asn Glu Val Asn 8125	Ala Ala Lys Gln 8130
Ala Leu Asn Gly Asn Asp 8135	Asn Leu Ala Asn Ala 8140	Lys Gln Gln Ala 8145
Lys Gln Gln Leu Ala Asn 8150	Leu Thr His Leu Asn 8155	Asp Ala Gln Lys 8160
Gln Ser Phe Glu Ser Gln 8165	Ile Thr Gln Ala Pro 8170	Leu Val Thr Asp 8175
Val Thr Thr Ile Asn Gln 8180	Lys Ala Gln Thr Leu 8185	Asp His Ala Met 8190
Glu Leu Leu Arg Asn Ser 8195	Val Ala Asp Asn Gln 8200	Thr Thr Leu Ala 8205
Ser Glu Asp Tyr His Asp 8210	Ala Thr Ala Gln Arg 8215	Gln Asn Asp Tyr 8220

Asn	Gln	Ala	Val	Thr	Ala	Ala	Asn	Asn	Ile	Ile	Asn	Gln	Thr	Thr
8225						8230					8235			
Ser	Pro	Thr	Met	Asn	Pro	Asp	Asp	Val	Asn	Gly	Ala	Thr	Thr	Gln
8240						8245					8250			
Val	Asn	Asn	Thr	Lys	Val	Ala	Leu	Asp	Gly	Asp	Glu	Asn	Leu	Ala
8255						8260					8265			
Ala	Ala	Lys	Gln	Gln	Ala	Asn	Asn	Arg	Leu	Asp	Gln	Leu	Asp	His
8270						8275					8280			
Leu	Asn	Asn	Ala	Gln	Lys	Gln	Gln	Leu	Gln	Ser	Gln	Ile	Thr	Gln
8285						8290					8295			
Ser	Ser	Asp	Ile	Ala	Ala	Val	Asn	Gly	His	Lys	Gln	Thr	Ala	Glu
8300						8305					8310			
Ser	Leu	Asn	Thr	Ala	Met	Gly	Asn	Leu	Ile	Asn	Ala	Ile	Ala	Asp
8315						8320					8325			
His	Gln	Ala	Val	Glu	Gln	Arg	Gly	Asn	Phe	Ile	Asn	Ala	Asp	Thr
8330						8335					8340			
Asp	Lys	Gln	Thr	Ala	Tyr	Asn	Thr	Ala	Val	Asn	Glu	Ala	Ala	Ala
8345						8350					8355			
Met	Ile	Asn	Lys	Gln	Thr	Gly	Gln	Asn	Ala	Asn	Gln	Thr	Glu	Val
8360						8365					8370			
Glu	Gln	Ala	Ile	Thr	Lys	Val	Gln	Thr	Thr	Leu	Gln	Ala	Leu	Asn
8375						8380					8385			
Gly	Asp	His	Asn	Leu	Gln	Val	Ala	Lys	Thr	Asn	Ala	Thr	Gln	Ala
8390						8395					8400			
Ile	Asp	Ala	Leu	Thr	Ser	Leu	Asn	Asp	Pro	Gln	Lys	Thr	Ala	Leu
8405						8410					8415			
Lys	Asp	Gln	Val	Thr	Ala	Ala	Thr	Leu	Val	Thr	Ala	Val	His	Gln
8420						8425					8430			
Ile	Glu	Gln	Asn	Ala	Asn	Thr	Leu	Asn	Gln	Ala	Met	His	Gly	Leu
8435						8440					8445			
Arg	Gln	Ser	Ile	Gln	Asp	Asn	Ala	Ala	Thr	Lys	Ala	Asn	Ser	Lys
8450						8455					8460			

ES 2 655 701 T3

Tyr	Ile	Asn	Glu	Asp	Gln	Pro	Glu	Gln	Gln	Asn	Tyr	Asp	Gln	Ala
8465						8470					8475			
Val	Gln	Ala	Ala	Asn	Asn	Ile	Ile	Asn	Glu	Gln	Thr	Ala	Thr	Leu
8480						8485					8490			
Asp	Asn	Asn	Ala	Ile	Asn	Gln	Ala	Ala	Thr	Thr	Val	Asn	Thr	Thr
8495						8500					8505			
Lys	Ala	Ala	Leu	His	Gly	Asp	Val	Lys	Leu	Gln	Asn	Asp	Lys	Asp
8510						8515					8520			
His	Ala	Lys	Gln	Thr	Val	Ser	Gln	Leu	Ala	His	Leu	Asn	Asn	Ala
8525						8530					8535			
Gln	Lys	His	Met	Glu	Asp	Thr	Leu	Ile	Asp	Ser	Glu	Thr	Thr	Arg
8540						8545					8550			
Thr	Ala	Val	Lys	Gln	Asp	Leu	Thr	Glu	Ala	Gln	Ala	Leu	Asp	Gln
8555						8560					8565			
Leu	Met	Asp	Ala	Leu	Gln	Gln	Ser	Ile	Ala	Asp	Lys	Asp	Ala	Thr
8570						8575					8580			
Arg	Ala	Ser	Ser	Ala	Tyr	Val	Asn	Ala	Glu	Pro	Asn	Lys	Lys	Gln
8585						8590					8595			
Ser	Tyr	Asp	Glu	Ala	Val	Gln	Asn	Ala	Glu	Ser	Ile	Ile	Ala	Gly
8600						8605					8610			
Leu	Asn	Asn	Pro	Thr	Ile	Asn	Lys	Gly	Asn	Val	Ser	Ser	Ala	Thr
8615						8620					8625			
Gln	Ala	Val	Ile	Ser	Ser	Lys	Asn	Ala	Leu	Asp	Gly	Val	Glu	Arg
8630						8635					8640			
Leu	Ala	Gln	Asp	Lys	Gln	Thr	Ala	Gly	Asn	Ser	Leu	Asn	His	Leu
8645						8650					8655			
Asp	Gln	Leu	Thr	Pro	Ala	Gln	Gln	Gln	Ala	Leu	Glu	Asn	Gln	Ile
8660						8665					8670			
Asn	Asn	Ala	Thr	Thr	Arg	Gly	Glu	Val	Ala	Gln	Lys	Leu	Thr	Glu
8675						8680					8685			
Ala	Gln	Ala	Leu	Asn	Gln	Ala	Met	Glu	Ala	Leu	Arg	Asn	Ser	Ile
8690						8695					8700			

ES 2 655 701 T3

Gln Asp 8705	Gln Gln Gln Thr	Glu 8710	Ala Gly Ser Lys Phe 8715	Ile Asn Glu
Asp Lys 8720	Pro Gln Lys Asp	Ala 8725	Tyr Gln Ala Ala Val 8730	Gln Asn Ala
Lys Asp 8735	Leu Ile Asn Gln Thr	Asn Asn Pro Thr 8740	Leu 8745	Asp Lys Ala
Gln Val 8750	Glu Gln Leu Thr	Gln 8755	Ala Val Asn Gln Ala 8760	Lys Asp Asn
Leu His 8765	Gly Asp Gln Lys	Leu 8770	Ala Asp Asp Lys 8775	Gln His Ala Val
Thr Asp 8780	Leu Asn Gln Leu	Asn 8785	Gly Leu Asn Asn Pro 8790	Gln Arg Gln
Ala Leu 8795	Glu Ser Gln Ile	Asn 8800	Asn Ala Ala Thr Arg 8805	Gly Glu Val
Ala Gln 8810	Lys Leu Ala Glu	Ala 8815	Lys Ala Leu Asp 8820	Gln Ala Met Gln
Ala Leu 8825	Arg Asn Ser Ile	Gln 8830	Asp Gln Gln Gln Thr 8835	Glu Ser Gly
Ser Lys 8840	Phe Ile Asn Glu	Asp 8845	Lys Pro Gln Lys Asp 8850	Ala Tyr Gln
Ala Ala 8855	Val Gln Asn Ala	Lys 8860	Asp Leu Ile Asn Gln 8865	Thr Gly Asn
Pro Thr 8870	Leu Asp Lys Ser	Gln 8875	Val Glu Gln Leu Thr 8880	Gln Ala Val
Thr Thr 8885	Ala Lys Asp Asn	Leu 8890	His Gly Asp Gln Lys 8895	Leu Ala Arg
Asp Gln 8900	Gln Gln Ala Val	Thr 8905	Thr Val Asn Ala Leu 8910	Pro Asn Leu
Asn His 8915	Ala Gln Gln Gln	Ala 8920	Leu Thr Asp Ala Ile 8925	Asn Ala Ala
Pro Thr	Arg Thr Glu Val Ala	Gln His Val Gln Thr	Ala Thr Glu	

ES 2 655 701 T3

8930						8935						8940
Leu Asp 8945	His	Ala	Met	Glu	Thr	Leu Lys Asn Lys 8950	Val	Asp	Gln	Val		
Asn Thr 8960	Asp	Lys	Ala	Gln	Pro	Asn Tyr Thr Glu 8965	Ala	Ser	Thr	Asp		
Lys Lys 8975	Glu	Ala	Val	Asp	Gln	Ala Leu Gln Ala 8980	Ala	Glu	Ser	Ile		
Thr Asp 8990	Pro	Thr	Asn	Gly	Ser	Asn Ala Asn Lys 8995	Asp	Ala	Val	Asp		
Gln Val 9005	Leu	Thr	Lys	Leu	Gln	Glu Lys Glu Asn 9010	Glu	Leu	Asn	Gly		
Asn Glu 9020	Arg	Val	Ala	Glu	Ala	Lys Thr Gln Ala 9025	Lys	Gln	Thr	Ile		
Asp Gln 9035	Leu	Thr	His	Leu	Asn	Ala Asp Gln Ile 9040	Ala	Thr	Ala	Lys		
Gln Asn 9050	Ile	Asp	Gln	Ala	Thr	Lys Leu Gln Pro 9055	Ile	Ala	Glu	Leu		
Val Asp 9065	Gln	Ala	Thr	Gln	Leu	Asn Gln Ser Met 9070	Asp	Gln	Leu	Gln		
Gln Ala 9080	Val	Asn	Glu	His	Ala	Asn Val Glu Gln 9085	Thr	Val	Asp	Tyr		
Thr Gln 9095	Ala	Asp	Ser	Asp	Lys	Gln Asn Ala Tyr 9100	Lys	Gln	Ala	Ile		
Ala Asp 9110	Ala	Glu	Asn	Val	Leu	Lys Gln Asn Ala 9115	Asn	Lys	Gln	Gln		
Val Asp 9125	Gln	Ala	Leu	Gln	Asn	Ile Leu Asn Ala 9130	Lys	Gln	Ala	Leu		
Asn Gly 9140	Asp	Glu	Arg	Val	Ala	Leu Ala Lys Thr 9145	Asn	Gly	Lys	His		
Asp Ile 9155	Asp	Gln	Leu	Asn	Ala	Leu Asn Asn Ala 9160	Gln	Gln	Asp	Gly		

Phe	Lys	Gly	Arg	Ile	Asp	Gln	Ser	Asn	Asp	Leu	Asn	Gln	Ile	Gln
	9170					9175					9180			
Gln	Ile	Val	Asp	Glu	Ala	Lys	Ala	Leu	Asn	Arg	Ala	Met	Asp	Gln
	9185					9190					9195			
Leu	Ser	Gln	Glu	Ile	Thr	Asp	Asn	Glu	Gly	Arg	Thr	Lys	Gly	Ser
	9200					9205					9210			
Thr	Asn	Tyr	Val	Asn	Ala	Asp	Thr	Gln	Val	Lys	Gln	Val	Tyr	Asp
	9215					9220					9225			
Glu	Thr	Val	Asp	Lys	Ala	Lys	Gln	Ala	Leu	Asp	Lys	Ser	Thr	Gly
	9230					9235					9240			
Gln	Asn	Leu	Thr	Ala	Lys	Gln	Val	Ile	Lys	Leu	Asn	Asp	Ala	Val
	9245					9250					9255			
Thr	Ala	Ala	Lys	Lys	Ala	Leu	Asn	Gly	Glu	Glu	Arg	Leu	Asn	Asn
	9260					9265					9270			
Arg	Lys	Ala	Glu	Ala	Leu	Gln	Arg	Leu	Asp	Gln	Leu	Thr	His	Leu
	9275					9280					9285			
Asn	Asn	Ala	Gln	Arg	Gln	Leu	Ala	Ile	Gln	Gln	Ile	Asn	Asn	Ala
	9290					9295					9300			
Glu	Thr	Leu	Asn	Lys	Ala	Ser	Arg	Ala	Ile	Asn	Arg	Ala	Thr	Lys
	9305					9310					9315			
Leu	Asp	Asn	Ala	Met	Gly	Ala	Val	Gln	Gln	Tyr	Ile	Asp	Glu	Gln
	9320					9325					9330			
His	Leu	Gly	Val	Ile	Ser	Ser	Thr	Asn	Tyr	Ile	Asn	Ala	Asp	Asp
	9335					9340					9345			
Asn	Leu	Lys	Ala	Asn	Tyr	Asp	Asn	Ala	Ile	Ala	Asn	Ala	Ala	His
	9350					9355					9360			
Glu	Leu	Asp	Lys	Val	Gln	Gly	Asn	Ala	Ile	Ala	Lys	Ala	Glu	Ala
	9365					9370					9375			
Glu	Gln	Leu	Lys	Gln	Asn	Ile	Ile	Asp	Ala	Gln	Asn	Ala	Leu	Asn
	9380					9385					9390			
Gly	Asp	Gln	Asn	Leu	Ala	Asn	Ala	Lys	Asp	Lys	Ala	Asn	Ala	Phe
	9395					9400					9405			

Val	Asn	Ser	Leu	Asn	Gly	Leu	Asn	Gln	Gln	Gln	Gln	Asp	Leu	Ala
9410						9415						9420		
His	Lys	Ala	Ile	Asn	Asn	Ala	Asp	Thr	Val	Ser	Asp	Val	Thr	Asp
9425						9430					9435			
Ile	Val	Asn	Asn	Gln	Ile	Asp	Leu	Asn	Asp	Ala	Met	Glu	Thr	Leu
9440						9445					9450			
Lys	His	Leu	Val	Asp	Asn	Glu	Ile	Pro	Asn	Ala	Glu	Gln	Thr	Val
9455						9460					9465			
Asn	Tyr	Gln	Asn	Ala	Asp	Asp	Asn	Ala	Lys	Thr	Asn	Phe	Asp	Asp
9470						9475					9480			
Ala	Lys	Arg	Leu	Ala	Asn	Thr	Leu	Leu	Asn	Ser	Asp	Asn	Thr	Asn
9485						9490					9495			
Val	Asn	Asp	Ile	Asn	Gly	Ala	Ile	Gln	Ala	Val	Asn	Asp	Ala	Ile
9500						9505					9510			
His	Asn	Leu	Asn	Gly	Asp	Gln	Arg	Leu	Gln	Asp	Ala	Lys	Asp	Lys
9515						9520					9525			
Ala	Ile	Gln	Ser	Ile	Asn	Gln	Ala	Leu	Ala	Asn	Lys	Leu	Lys	Glu
9530						9535					9540			
Ile	Glu	Ala	Ser	Asn	Ala	Thr	Asp	Gln	Asp	Lys	Leu	Ile	Ala	Lys
9545						9550					9555			
Asn	Lys	Ala	Glu	Glu	Leu	Ala	Asn	Ser	Ile	Ile	Asn	Asn	Ile	Asn
9560						9565					9570			
Lys	Ala	Thr	Ser	Asn	Gln	Ala	Val	Ser	Gln	Val	Gln	Thr	Ala	Gly
9575						9580					9585			
Asn	His	Ala	Ile	Glu	Gln	Val	His	Ala	Asn	Glu	Ile	Pro	Lys	Ala
9590						9595					9600			
Lys	Ile	Asp	Ala	Asn	Lys	Asp	Val	Asp	Lys	Gln	Val	Gln	Ala	Leu
9605						9610					9615			
Ile	Asp	Glu	Ile	Asp	Arg	Asn	Pro	Asn	Leu	Thr	Asp	Lys	Glu	Lys
9620						9625					9630			
Gln	Ala	Leu	Lys	Asp	Arg	Ile	Asn	Gln	Ile	Leu	Gln	Gln	Gly	His
9635						9640					9645			

Asn Gly 9650	Ile Asn Asn Ala Met 9655	Thr Lys Glu Glu Ile 9660	Glu Gln Ala
Lys Ala 9665	Gln Leu Ala Gln Ala 9670	Leu Gln Asp Ile Lys 9675	Asp Leu Val
Lys Ala 9680	Lys Glu Asp Ala Lys 9685	Gln Asp Val Asp Lys 9690	Gln Val Gln
Ala Leu 9695	Ile Asp Glu Ile Asp 9700	Gln Asn Pro Asn Leu 9705	Thr Asp Lys
Glu Lys 9710	Gln Ala Leu Lys Tyr 9715	Arg Ile Asn Gln Ile 9720	Leu Gln Gln
Gly His 9725	Asn Asp Ile Asn Asn 9730	Ala Leu Thr Lys Glu 9735	Glu Ile Glu
Gln Ala 9740	Lys Ala Gln Leu Ala 9745	Gln Ala Leu Gln Asp 9750	Ile Lys Asp
Leu Val 9755	Lys Ala Lys Glu Asp 9760	Ala Lys Asn Ala Ile 9765	Lys Ala Leu
Ala Asn 9770	Ala Lys Arg Asp Gln 9775	Ile Asn Ser Asn Pro 9780	Asp Leu Thr
Pro Glu 9785	Gln Lys Ala Lys Ala 9790	Leu Lys Glu Ile Asp 9795	Glu Ala Glu
Lys Arg 9800	Ala Leu Gln Asn Val 9805	Glu Asn Ala Gln Thr 9810	Ile Asp Gln
Leu Asn 9815	Arg Gly Leu Asn Leu 9820	Gly Leu Asp Asp Ile 9825	Arg Asn Thr
His Val 9830	Trp Glu Val Asp Glu 9835	Gln Pro Ala Val Asn 9840	Glu Ile Phe
Glu Ala 9845	Thr Pro Glu Gln Ile 9850	Leu Val Asn Gly Glu 9855	Leu Ile Val
His Arg 9860	Asp Asp Ile Ile Thr 9865	Glu Gln Asp Ile Leu 9870	Ala His Ile
Asn Leu	Ile Asp Gln Leu Ser	Ala Glu Val Ile Asp	Thr Pro Ser

ES 2 655 701 T3

9875						9880						9885
Thr Ala	Thr Ile Ser Asp	Ser	Leu Thr Ala Lys	Val	Glu Val Thr							
9890		9895		9900								
Leu Leu	Asp Gly Ser Lys	Val	Ile Val Asn Val	Pro	Val Lys Val							
9905		9910		9915								
Val Glu	Lys Glu Leu Ser	Val	Val Lys Gln Gln	Ala	Ile Glu Ser							
9920		9925		9930								
Ile Glu	Asn Ala Ala Gln	Gln	Lys Ile Asn Glu	Ile	Asn Asn Ser							
9935		9940		9945								
Val Thr	Leu Thr Leu Glu	Gln	Lys Glu Ala Ala	Ile	Ala Glu Val							
9950		9955		9960								
Asn Lys	Leu Lys Gln Gln	Ala	Ile Asp His Val	Asn	Asn Ala Pro							
9965		9970		9975								
Asp Val	His Ser Val Glu	Glu	Ile Gln Gln Gln	Glu	Gln Ala His							
9980		9985		9990								
Ile Glu	Gln Phe Asn Pro	Glu	Gln Phe Thr Ile	Glu	Gln Ala Lys							
9995		10000		10005								
Ser Asn	Ala Ile Lys Ser	Ile	Glu Asp Ala Ile	Gln	His Met Ile							
10010		10015		10020								
Asp Glu	Ile Lys Ala Arg	Thr	Asp Leu Thr Asp	Lys	Glu Lys Gln							
10025		10030		10035								
Glu Ala	Ile Ala Lys Leu	Asn	Gln Leu Lys Glu	Gln	Ala Ile Gln							
10040		10045		10050								
Ala Ile	Gln Arg Ala Gln	Ser	Ile Asp Glu Ile	Ser	Glu Gln Leu							
10055		10060		10065								
Glu Gln	Phe Lys Ala Gln	Met	Lys Ala Ala Asn	Pro	Thr Ala Lys							
10070		10075		10080								
Glu Leu	Ala Lys Arg Lys	Gln	Glu Ala Ile Ser	Arg	Ile Lys Asp							
10085		10090		10095								
Phe Ser	Asn Glu Lys Ile	Asn	Ser Ile Arg Asn	Ser	Glu Ile Gly							
10100		10105		10110								

ES 2 655 701 T3

Thr Ala 10115	Asp Glu Lys Gln 10120	Ala Met Asn Gln 10125	Asn Glu Ile
Val Leu 10130	Glu Thr Ile Arg 10135	Ile Asn Asn Ala 10140	His Thr Leu Gln
Gln Val 10145	Glu Ala Ala Leu 10150	Asn Gly Ile Ala 10155	Arg Ile Ser Ala
Val Gln 10160	Ile Val Thr Ser 10165	Arg Ala Lys Gln 10170	Ser Ser Ser Thr
Gly Asn 10175	Glu Ser Asn Ser 10180	Leu Thr Ile Gly 10185	Tyr Gly Thr Ala
Asn His 10190	Pro Phe Asn Ser 10195	Thr Ile Gly His 10200	Lys Lys Lys Leu
Asp Glu 10205	Asp Asp Asp Ile 10210	Pro Leu His Met 10215	Arg His Phe Ser
Asn Asn 10220	Phe Gly Asn Val 10225	Lys Asn Ala Ile 10230	Gly Val Val Gly
Ile Ser 10235	Gly Leu Leu Ala 10240	Phe Trp Phe Phe 10245	Ile Ala Lys Arg
Arg Arg 10250	Lys Glu Asp Glu 10255	Glu Glu Leu Glu 10260	Ile Arg Asp Asn
Asn Lys 10265	Asp Ser Ile Lys 10270	Thr Leu Asp Asp 10275	Thr Lys His Leu
Pro Leu 10280	Leu Phe Ala Lys 10285	Arg Arg Lys Glu 10290	Asp Glu Glu Asp
Val Thr 10295	Val Glu Glu Lys 10300	Ser Leu Asn Asn 10305	Gly Glu Ser Leu
Asp Lys 10310	Val Lys His Thr 10315	Phe Phe Leu Pro 10320	Lys Arg Arg Arg
Lys Glu 10325	Asp Glu Glu Asp 10330	Glu Val Thr Asn 10335	Glu Asn Thr Asp
Glu Lys 10340	Val Leu Lys Asp 10345	Glu His Ser Pro 10350	Leu Leu Phe Ala

ES 2 655 701 T3

Lys Arg Arg Lys Asp Lys Glu Glu Asp Val Glu Thr Thr Thr Ser
 10355 10360 10365
 Ile Glu Ser Lys Asp Glu Asp Val Pro Leu Leu Leu Ala Lys Lys
 10370 10375 10380
 Lys Asn Gln Lys Asp Asn Gln Ser Lys Asp Lys Lys Ser Ala Ser
 10385 10390 10395
 Lys Asn Thr Ser Lys Lys Val Ala Ala Lys Lys Lys Lys Lys Lys
 10400 10405 10410
 Ala Lys Lys Asn Lys Lys
 10415

<210> 25
 <211> 340
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus sp.*
 <400> 25

Met Lys Lys Lys Leu Leu Val Leu Thr Met Ser Thr Leu Phe Ala Thr
 1 5 10 15
 Gln Ile Met Asn Ser Asn His Ala Lys Ala Ser Val Thr Glu Ser Val
 20 25 30
 Asp Lys Lys Phe Val Val Pro Glu Ser Gly Ile Asn Lys Ile Ile Pro
 35 40 45
 Ala Tyr Asp Glu Phe Lys Asn Ser Pro Lys Val Asn Val Ser Asn Leu
 50 55 60
 Thr Asp Asn Lys Asn Phe Val Ala Ser Glu Asp Lys Leu Asn Lys Ile
 65 70 75 80
 Ala Asp Ser Ser Ala Ala Ser Lys Ile Val Asp Lys Asn Phe Val Val
 85 90 95
 Pro Glu Ser Lys Leu Gly Asn Ile Val Pro Glu Tyr Lys Glu Ile Asn
 100 105 110
 Asn Arg Val Asn Val Ala Thr Asn Asn Pro Ala Ser Gln Gln Val Asp
 115 120 125
 Lys His Phe Val Ala Lys Gly Pro Glu Val Asn Arg Phe Ile Thr Gln
 130 135 140

ES 2 655 701 T3

```

Asn Lys Val Asn His His Phe Ile Thr Thr Gln Thr His Tyr Lys Lys
145                      150                      155                      160

Val Ile Thr Ser Tyr Lys Ser Thr His Val His Lys His Val Asn His
                      165                      170                      175

Ala Lys Asp Ser Ile Asn Lys His Phe Ile Val Lys Pro Ser Glu Ser
                      180                      185                      190

Pro Arg Tyr Thr His Pro Ser Gln Ser Leu Ile Ile Lys His His Phe
                      195                      200                      205

Ala Val Pro Gly Tyr His Ala His Lys Phe Val Thr Pro Gly His Ala
210                      215                      220

Ser Ile Lys Ile Asn His Phe Cys Val Val Pro Gln Ile Asn Ser Phe
225                      230                      235                      240

Lys Val Ile Pro Pro Tyr Gly His Asn Ser His Arg Met His Val Pro
                      245                      250                      255

Ser Phe Gln Asn Asn Thr Thr Ala Thr His Gln Asn Ala Lys Val Asn
                      260                      265                      270

Lys Ala Tyr Asp Tyr Lys Tyr Phe Tyr Ser Tyr Lys Val Val Lys Gly
275                      280                      285

Val Lys Lys Tyr Phe Ser Phe Ser Gln Ser Asn Gly Tyr Lys Ile Gly
290                      295                      300

Lys Pro Ser Leu Asn Ile Lys Asn Val Asn Tyr Gln Tyr Ala Val Pro
305                      310                      315                      320

Ser Tyr Ser Pro Thr His Tyr Val Pro Glu Phe Lys Gly Ser Leu Pro
                      325                      330                      335

Ala Pro Arg Val
                      340

```

<210> 26
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus* sp.

<400> 26

```

Met Asn Phe Asn Asp Ile Glu Thr Met Val Lys Ser Lys Phe Lys Asp
1                      5                      10                      15

```

ES 2 655 701 T3

Ile Lys Lys His Ala Glu Glu Ile Ala His Glu Ile Glu Val Arg Ser
20 25 30

Gly Tyr Leu Arg Lys Ala Glu Gln Tyr Lys Arg Leu Glu Phe Asn Leu
35 40 45

Ser Phe Ala Leu Asp Asp Ile Glu Ser Thr Ala Lys Asp Val Gln Thr
50 55 60

Ala Lys Ser Ser Ala Asn Lys Asp Ser Val Thr Val Lys Gly Lys Ala
65 70 75 80

Pro Asn Thr Leu Tyr Ile Glu Lys Arg Asn Leu Met Lys Gln Lys Leu
85 90 95

Glu Met Leu Gly Glu Asp Ile Asp Lys Asn Lys Glu Ser Leu Gln Lys
100 105 110

Ala Lys Glu Ile Ala Gly Glu Lys Ala Ser Glu Tyr Phe Asn Lys Ala
115 120 125

Met Asn
130

<210> 27
<211> 636
<212> PRT
<213> *Staphylococcus* sp.

<400> 27

Met Lys Lys Gln Ile Ile Ser Leu Gly Ala Leu Ala Val Ala Ser Ser
1 5 10 15

Leu Phe Thr Trp Asp Asn Lys Ala Asp Ala Ile Val Thr Lys Asp Tyr
20 25 30

Ser Gly Lys Ser Gln Val Asn Ala Gly Ser Lys Asn Gly Thr Leu Ile
35 40 45

Asp Ser Arg Tyr Leu Asn Ser Ala Leu Tyr Tyr Leu Glu Asp Tyr Ile
50 55 60

Ile Tyr Ala Ile Gly Leu Thr Asn Lys Tyr Glu Tyr Gly Asp Asn Ile
65 70 75 80

Tyr Lys Glu Ala Lys Asp Arg Leu Leu Glu Lys Val Leu Arg Glu Asp
85 90 95

ES 2 655 701 T3

Gln Tyr Leu Leu Glu Arg Lys Lys Ser Gln Tyr Glu Asp Tyr Lys Gln
 100 105 110
 Trp Tyr Ala Asn Tyr Lys Lys Glu Asn Pro Arg Thr Asp Leu Lys Met
 115 120 125
 Ala Asn Phe His Lys Tyr Asn Leu Glu Glu Leu Ser Met Lys Glu Tyr
 130 135 140
 Asn Glu Leu Gln Asp Ala Leu Lys Arg Ala Leu Asp Asp Phe His Arg
 145 150 155 160
 Glu Val Lys Asp Ile Lys Asp Lys Asn Ser Asp Leu Lys Thr Phe Asn
 165 170 175
 Ala Ala Glu Glu Asp Lys Ala Thr Lys Glu Val Tyr Asp Leu Val Ser
 180 185 190
 Glu Ile Asp Thr Leu Val Val Ser Tyr Tyr Gly Asp Lys Asp Tyr Gly
 195 200 205
 Glu His Ala Lys Glu Leu Arg Ala Lys Leu Asp Leu Ile Leu Gly Asp
 210 215 220
 Thr Asp Asn Pro His Lys Ile Thr Asn Glu Arg Ile Lys Lys Glu Met
 225 230 235 240
 Ile Asp Asp Leu Asn Ser Ile Ile Asp Asp Phe Phe Met Glu Thr Lys
 245 250 255
 Gln Asn Arg Pro Lys Ser Ile Thr Lys Tyr Asn Pro Thr Thr His Asn
 260 265 270
 Tyr Lys Thr Asn Ser Asp Asn Lys Pro Asn Phe Asp Lys Leu Val Glu
 275 280 285
 Glu Thr Lys Lys Ala Val Lys Glu Ala Asp Asp Ser Trp Lys Lys Lys
 290 295 300
 Thr Val Lys Lys Tyr Gly Glu Thr Glu Thr Lys Ser Pro Val Val Lys
 305 310 315 320
 Glu Glu Lys Lys Val Glu Glu Pro Gln Ala Pro Lys Val Asp Asn Gln
 325 330 335
 Gln Glu Val Lys Thr Thr Ala Gly Lys Ala Glu Glu Thr Thr Gln Pro
 340 345 350

ES 2 655 701 T3

Val Ala Gln Pro Leu Val Lys Ile Pro Gln Gly Thr Ile Thr Gly Glu
 355 360 365
 Ile Val Lys Gly Pro Glu Tyr Pro Thr Met Glu Asn Lys Thr Val Gln
 370 375 380
 Gly Glu Ile Val Gln Gly Pro Asp Phe Leu Thr Met Glu Gln Ser Gly
 385 390 395 400
 Pro Ser Leu Ser Asn Asn Tyr Thr Asn Pro Pro Leu Thr Asn Pro Ile
 405 410 415
 Leu Glu Gly Leu Glu Gly Ser Ser Ser Lys Leu Glu Ile Lys Pro Gln
 420 425 430
 Gly Thr Glu Ser Thr Leu Lys Gly Thr Gln Gly Glu Ser Ser Asp Ile
 435 440 445
 Glu Val Lys Pro Gln Ala Thr Glu Thr Thr Glu Ala Ser Gln Tyr Gly
 450 455 460
 Pro Arg Pro Gln Phe Asn Lys Thr Pro Lys Tyr Val Lys Tyr Arg Asp
 465 470 475 480
 Ala Gly Thr Gly Ile Arg Glu Tyr Asn Asp Gly Thr Phe Gly Tyr Glu
 485 490 495
 Ala Arg Pro Arg Phe Asn Lys Pro Ser Glu Thr Asn Ala Tyr Asn Val
 500 505 510
 Thr Thr His Ala Asn Gly Gln Val Ser Tyr Gly Ala Arg Pro Thr Tyr
 515 520 525
 Lys Lys Pro Ser Glu Thr Asn Ala Tyr Asn Val Thr Thr His Ala Asn
 530 535 540
 Gly Gln Val Ser Tyr Gly Ala Arg Pro Thr Gln Asn Lys Pro Ser Lys
 545 550 555 560
 Thr Asn Ala Tyr Asn Val Thr Thr His Gly Asn Gly Gln Val Ser Tyr
 565 570 575
 Gly Ala Arg Pro Thr Gln Asn Lys Pro Ser Lys Thr Asn Ala Tyr Asn
 580 585 590
 Val Thr Thr His Ala Asn Gly Gln Val Ser Tyr Gly Ala Arg Pro Thr

ES 2 655 701 T3

595

600

605

Tyr Lys Lys Pro Ser Lys Thr Asn Ala Tyr Asn Val Thr Thr His Ala
610 615 620

Asp Gly Thr Ala Thr Tyr Gly Pro Arg Val Thr Lys
625 630 635

<210> 28
<211> 745
<212> PRT
<213> *Staphylococcus sp.*

<400> 28

Ala Glu Gln His Thr Pro Met Lys Ala His Ala Val Thr Thr Ile Asp
1 5 10 15

Lys Ala Thr Thr Asp Lys Gln Gln Val Pro Pro Thr Lys Glu Ala Ala
20 25 30

His His Ser Gly Lys Glu Ala Ala Thr Asn Val Ser Ala Ser Ala Gln
35 40 45

Gly Thr Ala Asp Asp Thr Asn Ser Lys Val Thr Ser Asn Ala Pro Ser
50 55 60

Asn Lys Pro Ser Thr Val Val Ser Thr Lys Val Asn Glu Thr Arg Asp
65 70 75 80

Val Asp Thr Gln Gln Ala Ser Thr Gln Lys Pro Thr His Thr Ala Thr
85 90 95

Phe Lys Leu Ser Asn Ala Lys Thr Ala Ser Leu Ser Pro Arg Met Phe
100 105 110

Ala Ala Asn Ala Pro Gln Thr Thr Thr His Lys Ile Leu His Thr Asn
115 120 125

Asp Ile His Gly Arg Leu Ala Glu Glu Lys Gly Arg Val Ile Gly Met
130 135 140

Ala Lys Leu Lys Thr Val Lys Glu Gln Glu Lys Pro Asp Leu Met Leu
145 150 155 160

Asp Ala Gly Asp Ala Phe Gln Gly Leu Pro Leu Ser Asn Gln Ser Lys
165 170 175

Gly Glu Glu Met Ala Lys Ala Met Asn Ala Val Gly Tyr Asp Ala Met

5

10

ES 2 655 701 T3

180					185					190					
Ala	Val	Gly	Asn	His	Glu	Phe	Asp	Phe	Gly	Tyr	Asp	Gln	Leu	Lys	Lys
		195					200					205			
Leu	Glu	Gly	Met	Leu	Asp	Phe	Pro	Met	Leu	Ser	Thr	Asn	Val	Tyr	Lys
	210					215					220				
Asp	Gly	Lys	Arg	Ala	Phe	Lys	Pro	Ser	Thr	Ile	Val	Thr	Lys	Asn	Gly
225					230					235					240
Ile	Arg	Tyr	Gly	Ile	Ile	Gly	Val	Thr	Thr	Pro	Glu	Thr	Lys	Thr	Lys
				245					250					255	
Thr	Arg	Pro	Glu	Gly	Ile	Lys	Gly	Val	Glu	Phe	Arg	Asp	Pro	Leu	Gln
			260					265					270		
Ser	Val	Thr	Ala	Glu	Met	Met	Arg	Ile	Tyr	Lys	Asp	Val	Asp	Thr	Phe
		275					280					285			
Val	Val	Ile	Ser	His	Leu	Gly	Ile	Asp	Pro	Ser	Thr	Gln	Glu	Thr	Trp
	290					295					300				
Arg	Gly	Asp	Tyr	Leu	Val	Lys	Gln	Leu	Ser	Gln	Asn	Pro	Gln	Leu	Lys
305					310					315					320
Lys	Arg	Ile	Thr	Val	Ile	Asp	Gly	His	Ser	His	Thr	Val	Leu	Gln	Asn
				325					330					335	
Gly	Gln	Ile	Tyr	Asn	Asn	Asp	Ala	Leu	Ala	Gln	Thr	Gly	Thr	Ala	Leu
			340					345					350		
Ala	Asn	Ile	Gly	Lys	Ile	Thr	Phe	Asn	Tyr	Arg	Asn	Gly	Glu	Val	Ser
		355					360					365			
Asn	Ile	Lys	Pro	Ser	Leu	Ile	Asn	Val	Lys	Asp	Val	Glu	Asn	Val	Thr
	370					375					380				
Pro	Asn	Lys	Ala	Leu	Ala	Glu	Gln	Ile	Asn	Gln	Ala	Asp	Gln	Thr	Phe
385					390					395					400
Arg	Ala	Gln	Thr	Ala	Glu	Val	Ile	Ile	Pro	Asn	Asn	Thr	Ile	Asp	Phe
				405					410					415	
Lys	Gly	Glu	Arg	Asp	Asp	Val	Arg	Thr	Arg	Glu	Thr	Asn	Leu	Gly	Asn
			420				425						430		

Ala	Ile	Ala	Asp	Ala	Met	Glu	Ala	Tyr	Gly	Val	Lys	Asn	Phe	Ser	Lys
		435					440						445		
Lys	Thr	Asp	Phe	Ala	Val	Thr	Asn	Gly	Gly	Gly	Ile	Arg	Ala	Ser	Ile
	450					455					460				
Ala	Lys	Gly	Lys	Val	Thr	Arg	Tyr	Asp	Leu	Ile	Ser	Val	Leu	Pro	Phe
465					470					475					480
Gly	Asn	Thr	Ile	Ala	Gln	Ile	Asp	Val	Lys	Gly	Ser	Asp	Val	Trp	Thr
				485					490					495	
Ala	Phe	Glu	His	Ser	Leu	Gly	Ala	Pro	Thr	Thr	Gln	Lys	Asp	Gly	Lys
			500					505					510		
Thr	Val	Leu	Thr	Ala	Asn	Gly	Gly	Leu	Leu	His	Ile	Ser	Asp	Ser	Ile
		515					520					525			
Arg	Val	Tyr	Tyr	Asp	Ile	Asn	Lys	Pro	Ser	Gly	Lys	Arg	Ile	Asn	Ala
	530					535					540				
Ile	Gln	Ile	Leu	Asn	Lys	Glu	Thr	Gly	Lys	Phe	Glu	Asn	Ile	Asp	Leu
545					550					555					560
Lys	Arg	Val	Tyr	His	Val	Thr	Met	Asn	Asp	Phe	Thr	Ala	Ser	Gly	Gly
				565					570					575	
Asp	Gly	Tyr	Ser	Met	Phe	Gly	Gly	Pro	Arg	Glu	Glu	Gly	Ile	Ser	Leu
			580					585					590		
Asp	Gln	Val	Leu	Ala	Ser	Tyr	Leu	Lys	Thr	Ala	Asn	Leu	Ala	Lys	Tyr
		595					600					605			
Asp	Thr	Thr	Glu	Pro	Gln	Arg	Met	Leu	Leu	Gly	Lys	Pro	Ala	Val	Ser
	610					615					620				
Glu	Gln	Pro	Ala	Lys	Gly	Gln	Gln	Gly	Ser	Lys	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly
625					630					635					640
Lys	Asp	Thr	Gln	Pro	Ile	Gly	Asp	Asp	Lys	Val	Met	Asp	Pro	Ala	Lys
				645					650					655	
Lys	Pro	Ala	Pro	Gly	Lys	Val	Val	Leu	Leu	Leu	Ala	His	Arg	Gly	Thr
			660					665					670		
Val	Ser	Ser	Gly	Thr	Glu	Gly	Ser	Gly	Arg	Thr	Ile	Glu	Gly	Ala	Thr
		675					680					685			

ES 2 655 701 T3

Val Ser Ser Lys Ser Gly Lys Gln Leu Ala Arg Met Ser Val Pro Lys
690 695 700

Gly Ser Ala His Glu Lys Gln Leu Pro Lys Thr Gly Thr Asn Gln Ser
705 710 715 720

Ser Ser Pro Glu Ala Met Phe Val Leu Leu Ala Gly Ile Gly Leu Ile
725 730 735

Ala Thr Val Arg Arg Arg Lys Ala Ser
740 745

<210> 29
<211> 628
<212> PRT
<213> *Staphylococcus sp.*

<400> 29

Met Ser Asp Arg Phe Ile Lys Phe Asn Asp Glu Gln Leu Asp Ala Lys
1 5 10 15

Gln Val Met Met Leu Gln Asp Leu Ala Arg Leu Leu Leu Lys Asn Glu
20 25 30

Gln Thr Gln Val Lys Ile Gln Lys Phe Pro Tyr Tyr Asn Pro Val Gln
35 40 45

Asn Val Leu Ile Thr Ser Trp Phe Trp Ser His Arg Pro Ser His Ile
50 55 60

Glu Met Ala Gly Leu Lys Thr Asp Val Met Leu Ala Ala Tyr Gly Tyr
65 70 75 80

His Met Met Asp Val Gln Ile Val Asn Glu Val Val Gln Asp Lys Thr
85 90 95

Phe Lys His Pro Lys Phe Tyr Gln Gln Leu Phe Lys Leu Leu Glu Asp
100 105 110

Met Arg Val Leu Asn Ser Ile Lys Val Glu Arg Pro Ser Thr Ala Lys
115 120 125

Leu Ile Asp Leu Arg Leu Asp Thr Arg Ile Ser Tyr Thr Glu Ser Gln
130 135 140

Ile Lys Val Tyr Arg Thr Lys Thr Gln Tyr Thr Asp Leu Leu Phe Leu
145 150 155 160

ES 2 655 701 T3

Tyr	Leu	Glu	His	Ala	Phe	Leu	Ser	Gln	Asp	Phe	Phe	Asp	Ile	Pro	Ser	
				165					170					175		
Ile	His	Ser	Asp	Leu	Asp	Asp	Ile	Leu	Val	Asn	Met	Phe	Leu	Tyr	Leu	
			180					185					190			
Pro	Asn	Phe	Phe	Gln	Asn	Gln	Asn	Ser	Glu	Asp	Asn	Met	Tyr	Leu	Ala	
		195					200					205				
Gln	Arg	Ile	Met	Tyr	Gln	Val	Asp	Asp	Ile	Leu	Lys	Glu	Asp	Met	Leu	
	210					215					220					
Asn	Glu	Tyr	Tyr	Tyr	Leu	Pro	Lys	Thr	Leu	Tyr	Asn	Thr	Leu	Ala	Ser	
225					230					235					240	
Pro	Glu	Phe	Asp	Asp	Leu	Lys	Arg	Thr	Asp	Ala	Ser	Gln	Val	Asp	Gly	
				245					250					255		
Gln	Asp	Asp	Thr	Ser	Glu	Asp	Asp	Asp	Asn	Glu	Ser	Glu	Lys	Ala	Asp	
			260					265					270			
Ser	Lys	Ser	Ala	Asp	Ser	Glu	Ser	Lys	Gly	Gly	Ala	Tyr	Leu	Glu	Met	
		275					280					285				
Glu	Leu	His	Glu	Gly	Gln	Asn	Ser	Glu	Thr	Leu	Gly	Asn	Asp	Glu	Ala	
	290					295					300					
Arg	Glu	Gly	Asp	Ala	Thr	Asp	Asp	Met	Thr	Asp	Met	Met	Thr	Lys	Lys	
305					310					315					320	
Gly	Lys	Gly	Ser	Asn	Asp	Thr	Leu	Asn	Arg	Glu	Glu	Gly	Asp	Ala	Val	
				325					330					335		
Gly	Gln	Ser	Gln	Ala	Phe	Gln	Leu	Asp	Gly	Val	Asn	Lys	Asn	Val	Glu	
			340					345					350			
Ile	Lys	Trp	Gln	Ile	Pro	Glu	Ile	Glu	Pro	Gln	Tyr	Val	Leu	Glu	Tyr	
		355					360					365				
Gln	Glu	Ser	Lys	Gln	Asp	Val	Gln	Tyr	Glu	Ile	Lys	Asp	Leu	Ile	Gln	
	370					375					380					
Ile	Ile	Lys	Lys	Thr	Ile	Glu	Arg	Glu	Gln	Arg	Asp	Ala	Arg	Phe	Asn	
385					390					395					400	
Leu	Thr	Lys	Gly	Arg	Leu	Gln	Lys	Asp	Leu	Ile	Asn	Trp	Phe	Ile	Asp	
				405					410					415		

ES 2 655 701 T3

Asp Gln Tyr Lys Leu Phe Tyr Lys Lys Gln Asp Leu Ser Lys Ser Phe
 420 425 430
 Asp Ala Thr Phe Thr Leu Leu Ile Asp Ala Ser Ala Ser Met His Asp
 435 440 445
 Lys Met Ala Glu Thr Lys Lys Gly Val Val Leu Phe His Glu Thr Leu
 450 455 460
 Lys Ala Leu Asn Ile Lys His Glu Ile Leu Ser Phe Ser Glu Asp Ala
 465 470 475 480
 Phe Asp Ser Asp Glu His Ala Gln Pro Asn Ile Ile Asn Glu Ile Ile
 485 490 495
 Asn Tyr Asp Tyr Ser Thr Phe Glu Lys Asp Gly Pro Arg Ile Met Ala
 500 505 510
 Leu Glu Pro Gln Asp Asp Asn Arg Asp Gly Val Ala Ile Arg Val Ala
 515 520 525
 Ser Glu Arg Leu Met Arg Arg Asn Gln His Gln Arg Phe Leu Ile Val
 530 535 540
 Phe Ser Asp Gly Glu Pro Ser Ala Phe Asn Tyr Ser Gln Asp Gly Ile
 545 550 555 560
 Ile Asp Thr Tyr Glu Ala Val Glu Met Ser Arg Lys Phe Gly Ile Glu
 565 570 575
 Val Phe Asn Val Phe Leu Ser Gln Asp Pro Ile Thr Glu Asp Val Glu
 580 585 590
 Gln Thr Ile His Asn Ile Tyr Gly Gln Tyr Ala Ile Phe Val Glu Gly
 595 600 605
 Val Ala His Leu Pro Gly His Leu Ser Pro Leu Leu Lys Lys Leu Leu
 610 615 620
 Leu Lys Ser Leu
 625

<210> 30
 <211> 154
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus* sp.

<400> 30

ES 2 655 701 T3

Ala Glu Ile Asn Lys Gln Thr Thr Ser Gln Gly Val Thr Thr Glu Lys
1 5 10 15

Asn Asn Gly Ile Ala Val Leu Glu Gln Asp Val Ile Thr Pro Thr Val
20 25 30

Lys Pro Gln Ala Lys Gln Asp Ile Ile Gln Ala Val Thr Thr Arg Lys
35 40 45

Gln Gln Ile Lys Lys Ser Asn Ala Ser Leu Gln Asp Glu Lys Asp Val
50 55 60

Ala Asn Asp Lys Ile Gly Lys Ile Glu Thr Lys Ala Ile Lys Asp Ile
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Thr Asn Ala Gln Val Glu Ala Ile Lys Thr Lys Ala
85 90 95

Ile Asn Asp Ile Asn Gln Thr Thr Pro Ala Thr Thr Ala Lys Ala Ala
100 105 110

Ala Leu Glu Glu Phe Asp Glu Val Val Gln Ala Gln Ile Asp Gln Ala
115 120 125

Pro Leu Asn Pro Asp Thr Thr Asn Glu Glu Val Ala Glu Ala Ile Glu
130 135 140

Arg Ile Asn Ala Ala Lys Val Ser Gly Val
145 150

<210> 31
<211> 584
<212> PRT
<213> *Staphylococcus sp.*

<400> 31

Met Lys Phe Lys Ser Leu Ile Thr Thr Thr Leu Ala Leu Gly Val Leu
1 5 10 15

Ala Ser Thr Gly Ala Asn Phe Asn Asn Asn Glu Ala Ser Ala Ala Ala
20 25 30

Lys Pro Leu Asp Lys Ser Ser Ser Ser Leu His His Gly Tyr Ser Lys
35 40 45

Val His Val Pro Tyr Ala Ile Thr Val Asn Gly Thr Ser Gln Asn Ile
50 55 60

ES 2 655 701 T3

Leu Ser Ser Leu Thr Phe Asn Lys Asn Gln Asn Ile Ser Tyr Lys Asp
 65 70 75 80
 Leu Glu Asp Arg Val Lys Ser Val Leu Lys Ser Asp Arg Gly Ile Ser
 85 90 95
 Asp Ile Asp Leu Arg Leu Ser Lys Gln Ala Lys Tyr Thr Val Tyr Phe
 100 105 110
 Lys Asn Gly Thr Lys Lys Val Ile Asp Leu Lys Ala Gly Ile Tyr Thr
 115 120 125
 Ala Asp Leu Ile Asn Thr Ser Glu Ile Lys Ala Ile Asn Ile Asn Val
 130 135 140
 Asp Thr Lys Lys Gln Val Glu Asp Lys Lys Lys Asp Lys Ala Asn Tyr
 145 150 155 160
 Gln Val Pro Tyr Thr Ile Thr Val Asn Gly Thr Ser Gln Asn Ile Leu
 165 170 175
 Ser Asn Leu Thr Phe Asn Lys Asn Gln Asn Ile Ser Tyr Lys Asp Leu
 180 185 190
 Glu Asp Lys Val Lys Ser Val Leu Glu Ser Asn Arg Gly Ile Thr Asp
 195 200 205
 Val Asp Leu Arg Leu Ser Lys Gln Ala Lys Tyr Thr Val Asn Phe Lys
 210 215 220
 Asn Gly Thr Lys Lys Val Ile Asp Leu Lys Ser Gly Ile Tyr Thr Ala
 225 230 235 240
 Asn Leu Ile Asn Ser Ser Asp Ile Lys Ser Ile Asn Ile Asn Val Asp
 245 250 255
 Thr Lys Lys His Ile Glu Asn Lys Ala Lys Arg Asn Tyr Gln Val Pro
 260 265 270
 Tyr Ser Ile Asn Leu Asn Gly Thr Ser Thr Asn Ile Leu Ser Asn Leu
 275 280 285
 Ser Phe Ser Asn Lys Pro Trp Thr Asn Tyr Lys Asn Leu Thr Ser Gln
 290 295 300
 Ile Lys Ser Val Leu Lys His Asp Arg Gly Ile Ser Glu Gln Asp Leu

ES 2 655 701 T3

305						310										315												320
Lys	Tyr	Ala	Lys	Lys	Ala	Tyr	Tyr	Thr	Val	Tyr	Phe	Lys	Asn	Gly	Gly													
				325					330					335														
Lys	Arg	Ile	Leu	Gln	Leu	Asn	Ser	Lys	Asn	Tyr	Thr	Ala	Asn	Leu	Val													
			340					345					350															
His	Ala	Lys	Asp	Val	Lys	Arg	Ile	Glu	Ile	Thr	Val	Lys	Thr	Gly	Thr													
		355					360					365																
Lys	Ala	Lys	Ala	Asp	Arg	Tyr	Val	Pro	Tyr	Thr	Ile	Ala	Val	Asn	Gly													
		370				375					380																	
Thr	Ser	Thr	Pro	Ile	Leu	Ser	Asp	Leu	Lys	Phe	Thr	Gly	Asp	Pro	Arg													
385					390					395					400													
Val	Gly	Tyr	Lys	Asp	Ile	Ser	Lys	Lys	Val	Lys	Ser	Val	Leu	Lys	His													
				405					410					415														
Asp	Arg	Gly	Ile	Gly	Glu	Arg	Glu	Leu	Lys	Tyr	Ala	Lys	Lys	Ala	Thr													
			420				425						430															
Tyr	Thr	Val	His	Phe	Lys	Asn	Gly	Thr	Lys	Lys	Val	Ile	Asn	Ile	Asn													
		435					440					445																
Ser	Asn	Ile	Ser	Gln	Leu	Asn	Leu	Leu	Tyr	Val	Gln	Asp	Ile	Lys	Lys													
		450				455					460																	
Ile	Asp	Ile	Asp	Val	Lys	Thr	Gly	Thr	Lys	Ala	Lys	Ala	Asp	Ser	Tyr													
465					470					475				480														
Val	Pro	Tyr	Thr	Ile	Ala	Val	Asn	Gly	Thr	Ser	Thr	Pro	Ile	Leu	Ser													
				485					490					495														
Lys	Leu	Lys	Ile	Ser	Asn	Lys	Gln	Leu	Ile	Ser	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Asn													
			500					505					510															
Asp	Lys	Val	Lys	Ser	Val	Leu	Lys	Ser	Glu	Arg	Gly	Ile	Ser	Asp	Leu													
		515					520					525																
Asp	Leu	Lys	Phe	Ala	Lys	Gln	Ala	Lys	Tyr	Thr	Val	Tyr	Phe	Lys	Asn													
		530				535					540																	
Gly	Lys	Lys	Gln	Val	Val	Asn	Leu	Lys	Ser	Asp	Ile	Phe	Thr	Pro	Asn													
545					550					555					560													

ES 2 655 701 T3

Leu Phe Ser Ala Lys Asp Ile Lys Lys Ile Asp Ile Asp Val Lys Gln
565 570 575

Tyr Thr Lys Ser Lys Lys Asn Lys
580

<210> 32
<211> 508
<212> PRT
<213> *Staphylococcus* sp.
<400> 32

Met Lys Asn Lys Leu Leu Val Leu Ser Leu Gly Ala Leu Cys Val Ser
1 5 10 15

Gln Ile Trp Glu Ser Asn Arg Ala Ser Ala Val Val Ser Gly Glu Lys
20 25 30

Asn Pro Tyr Val Ser Glu Ser Leu Lys Leu Thr Asn Asn Lys Asn Lys
35 40 45

Ser Arg Thr Val Glu Glu Tyr Lys Lys Ser Leu Asp Asp Leu Ile Trp
50 55 60

Ser Phe Pro Asn Leu Asp Asn Glu Arg Phe Asp Asn Pro Glu Tyr Lys
65 70 75 80

Glu Ala Met Lys Lys Tyr Gln Gln Arg Phe Met Ala Glu Asp Glu Ala
85 90 95

Leu Lys Lys Phe Phe Ser Glu Glu Lys Lys Ile Lys Asn Gly Asn Thr
100 105 110

Asp Asn Leu Asp Tyr Leu Gly Leu Ser His Glu Arg Tyr Glu Ser Val
115 120 125

Phe Asn Thr Leu Lys Lys Gln Ser Glu Glu Phe Leu Lys Glu Ile Glu
130 135 140

Asp Ile Lys Lys Asp Asn Pro Glu Leu Lys Asp Phe Asn Glu Glu Glu
145 150 155 160

Gln Leu Lys Cys Asp Leu Glu Leu Asn Lys Leu Glu Asn Gln Ile Leu
165 170 175

Met Leu Gly Lys Thr Phe Tyr Gln Asn Tyr Arg Asp Asp Val Glu Ser
180 185 190

ES 2 655 701 T3

Leu Tyr Ser Lys Leu Asp Leu Ile Met Gly Tyr Lys Asp Glu Glu Arg
 195 200 205
 Ala Asn Lys Lys Ala Val Asn Lys Arg Met Leu Glu Asn Lys Lys Glu
 210 215 220
 Asp Leu Glu Thr Ile Ile Asp Glu Phe Phe Ser Asp Ile Asp Lys Thr
 225 230 235 240
 Arg Pro Asn Asn Ile Pro Val Leu Glu Asp Glu Lys Gln Glu Glu Lys
 245 250 255
 Asn His Lys Asn Met Ala Gln Leu Lys Ser Asp Thr Glu Ala Ala Lys
 260 265 270
 Ser Asp Glu Ser Lys Arg Ser Lys Arg Ser Lys Arg Ser Leu Asn Thr
 275 280 285
 Gln Asn His Lys Pro Ala Ser Gln Glu Val Ser Glu Gln Gln Lys Ala
 290 295 300
 Glu Tyr Asp Lys Arg Ala Glu Glu Arg Lys Ala Arg Phe Leu Asp Asn
 305 310 315 320
 Gln Lys Ile Lys Lys Thr Pro Val Val Ser Leu Glu Tyr Asp Phe Glu
 325 330 335
 His Lys Gln Arg Ile Asp Asn Glu Asn Asp Lys Lys Leu Val Val Ser
 340 345 350
 Ala Pro Thr Lys Lys Pro Thr Ser Pro Thr Thr Tyr Thr Glu Thr Thr
 355 360 365
 Thr Gln Val Pro Met Pro Thr Val Glu Arg Gln Thr Gln Gln Ile
 370 375 380
 Ile Tyr Asn Ala Pro Lys Gln Leu Ala Gly Leu Asn Gly Glu Ser His
 385 390 395 400
 Asp Phe Thr Thr Thr His Gln Ser Pro Thr Thr Ser Asn His Thr His
 405 410 415
 Asn Asn Val Val Glu Phe Glu Glu Thr Ser Ala Leu Pro Gly Arg Lys
 420 425 430
 Ser Gly Ser Leu Val Gly Ile Ser Gln Ile Asp Ser Ser His Leu Thr
 435 440 445

ES 2 655 701 T3

Glu Arg Glu Lys Arg Val Ile Lys Arg Glu His Val Arg Glu Ala Gln
 450 455 460

Lys Leu Val Asp Asn Tyr Lys Asp Thr His Ser Tyr Lys Asp Arg Ile
 465 470 475 480

Asn Ala Gln Gln Lys Val Asn Thr Leu Ser Glu Gly His Gln Lys Arg
 485 490 495

Phe Asn Lys Gln Ile Asn Lys Val Tyr Asn Gly Lys
 500 505

<210> 33
 <211> 520
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus sp.*
 <400> 33

Met Leu Thr Leu Gln Ile His Thr Gly Gly Ile Asn Leu Lys Lys Lys
 1 5 10 15

Asn Ile Tyr Ser Ile Arg Lys Leu Gly Val Gly Ile Ala Ser Val Thr
 20 25 30

Leu Gly Thr Leu Leu Ile Ser Gly Gly Val Thr Pro Ala Ala Asn Ala
 35 40 45

Ala Gln His Asp Glu Ala Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Gln Val Leu Asn
 50 55 60

Met Pro Asn Leu Asn Ala Asp Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu
 65 70 75 80

Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Val Leu Gly Glu Ala Gln Lys
 85 90 95

Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe
 100 105 110

Asn Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn
 115 120 125

Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp
 130 135 140

Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu
 145 150 155 160

ES 2 655 701 T3

Ser	Gln	Ala	Pro	Lys	Ala	Asp	Asn	Asn	Phe	Asn	Lys	Glu	Gln	Gln	Asn	
				165					170					175		
Ala	Phe	Tyr	Glu	Ile	Leu	Asn	Met	Pro	Asn	Leu	Asn	Glu	Glu	Gln	Arg	
			180					185					190			
Asn	Gly	Phe	Ile	Gln	Ser	Leu	Lys	Asp	Asp	Pro	Ser	Gln	Ser	Ala	Asn	
		195					200					205				
Leu	Leu	Ser	Glu	Ala	Lys	Lys	Leu	Asn	Glu	Ser	Gln	Ala	Pro	Lys	Ala	
	210					215					220					
Asp	Asn	Lys	Phe	Asn	Lys	Glu	Gln	Gln	Asn	Ala	Phe	Tyr	Glu	Ile	Leu	
225					230					235					240	
His	Leu	Pro	Asn	Leu	Asn	Glu	Glu	Gln	Arg	Asn	Gly	Phe	Ile	Gln	Ser	
			245						250					255		
Leu	Lys	Asp	Asp	Pro	Ser	Gln	Ser	Ala	Asn	Leu	Leu	Ala	Glu	Ala	Lys	
			260					265					270			
Lys	Leu	Asn	Asp	Ala	Gln	Ala	Pro	Lys	Ala	Asp	Asn	Lys	Phe	Asn	Lys	
		275					280					285				
Glu	Gln	Gln	Asn	Ala	Phe	Tyr	Glu	Ile	Leu	His	Leu	Pro	Asn	Leu	Thr	
	290					295					300					
Glu	Glu	Gln	Arg	Asn	Gly	Phe	Ile	Gln	Ser	Leu	Lys	Asp	Asp	Pro	Ser	
305					310					315					320	
Val	Ser	Lys	Glu	Ile	Leu	Ala	Glu	Ala	Lys	Lys	Leu	Asn	Asp	Ala	Gln	
			325						330					335		
Ala	Pro	Lys	Glu	Glu	Asp	Asn	Asn	Lys	Pro	Gly	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	
			340					345					350			
Lys	Pro	Gly	Lys	Glu	Asp	Asn	Asn	Lys	Pro	Gly	Lys	Glu	Asp	Asn	Lys	
		355					360					365				
Lys	Pro	Gly	Lys	Glu	Asp	Asn	Asn	Lys	Pro	Gly	Lys	Glu	Asp	Asn	Asn	
	370					375					380					
Lys	Pro	Gly	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	Lys	Pro	Gly	Lys	Glu	Asp	Asn	Lys	
385					390					395					400	
Lys	Pro	Gly	Lys	Glu	Asp	Asn	Asn	Lys	Pro	Gly	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	
				405					410					415		

ES 2 655 701 T3

Lys Pro Gly Lys Glu Asp Gly Asn Gly Val His Val Val Lys Pro Gly
420 425 430

Asp Thr Val Asn Asp Ile Ala Lys Ala Asn Gly Thr Thr Ala Asp Lys
435 440 445

Ile Ala Ala Asp Asn Lys Leu Ala Asp Lys Asn Met Ile Lys Pro Gly
450 455 460

Gln Glu Leu Val Val Asp Lys Lys Gln Pro Ala Asn His Ala Asp Ala
465 470 475 480

Asn Lys Ala Gln Ala Leu Pro Glu Thr Gly Glu Glu Asn Pro Phe Ile
485 490 495

Gly Thr Thr Val Phe Gly Gly Leu Ser Leu Ala Leu Gly Ala Ala Leu
500 505 510

Leu Ala Gly Arg Arg Arg Glu Leu
515 520

<210> 34
<211> 291
<212> PRT
<213> *Staphylococcus sp.*
<400> 34

Ala Gln His Asp Glu Ala Lys Lys Asn Ala Phe Tyr Gln Val Leu Asn
1 5 10 15

Met Pro Asn Leu Asn Ala Asp Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu
20 25 30

Lys Ala Ala Pro Ser Gln Ser Ala Asn Val Leu Gly Glu Ala Gln Lys
35 40 45

Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe
50 55 60

Asn Lys Asp Lys Lys Ser Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn
65 70 75 80

Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Ala Ala
85 90 95

Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu
100 105 110

ES 2 655 701 T3

Ser Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn Asn Phe Asn Lys Glu Lys Lys Asn
115 120 125

Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg
130 135 140

Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Ala Ala Pro Ser Gln Ser Ala Asn
145 150 155 160

Leu Leu Ser Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys Ala
165 170 175

Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Lys Lys Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu
180 185 190

His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser
195 200 205

Leu Lys Ala Ala Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys
210 215 220

Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys
225 230 235 240

Glu Lys Lys Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr
245 250 255

Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Ala Ala Pro Ser
260 265 270

Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln
275 280 285

Ala Pro Lys
290

<210> 35

<211> 34

5 <212> ADN

<213> *Staphylococcus* sp.

<400> 35

10 gctgcacata tggcgcaaca cgatgaagct caac 34

<210> 36

<211> 30

<212> ADN

<213> *Staphylococcus* sp.

15

<400> 36

agtggtatcct tatgctttgt tagcatctgc 30

<210> 37
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus sp.*
 5
 <400> 37

 Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
 1 5 10 15

 Arg Gly Ser
 10
 <210> 38
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus sp.*
 15
 <400> 38
 aacatatgtt caacaaagat caacaaagc 29

 <210> 39
 <211> 29
 <212> ADN
 20
 <213> *Staphylococcus sp.*

 <400> 39
 aaggatccag attcggttaa tttttagc 29
 25

 <210> 40
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus sp.*
 30
 <400> 40
 cttcattcaa agtcttaaag ccgcccgaag ccaaagcact aac 43

 <210> 41
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus sp.*
 35

 <400> 41
 40
 gtttagtgctt tggcttgggg cggctttaag actttgaatg aag 43

 <210> 42
 <211> 42
 <212> ADN
 45
 <213> *Staphylococcus sp.*

 <400> 42
 catatgttca acaaagataa aaaaagcgcc ttctatgaaa tc 42
 50
 <210> 43
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus sp.*
 55
 <400> 43
 gatttcatag aaggcgcttt tttatcttt gttgaacata tg 42

 <210> 44
 <211> 42
 60
 <212> ADN

<213> *Staphylococcus* sp.
 <400> 44
 catatgttca acaaagatgg aggaagcgcc ttctatgaaa tc 42
 5
 <210> 45
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus* sp.
 10
 <400> 45
 gatttcatag aaggcgcttc ctccatcttt gttgaacata tg 42
 15
 <210> 46
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus* sp.
 20
 <400> 46
 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctg atgactaagt tgaaaaaaga ag 52
 25
 <210> 47
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus* sp.
 <400> 47
 aaggatcccc tccaaaatgt aattgccc 28
 30
 <210> 48
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus* sp.
 35
 <400> 48
 aaggatccgt ttgtaactct atccaaagac 30
 40
 <210> 49
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus* sp.
 <400> 49
 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtg acacctattg cacgattcg 49
 45
 <210> 50
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus* sp.
 50
 <400> 50
 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctc agatagcgat tcagattcag 50
 55
 <210> 51
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus* sp.
 <400> 51
 aaggatccct gtattttctc cttaattttc c 31
 60
 <210> 52
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus* sp.
 65

<400> 52
 aaggatccca tggctgcaaa gcaaataatg 30

 5 <210> 53
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus sp.*

 10 <400> 53
 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtg ccctgggtga acaaattat g 51

 15 <210> 54
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus sp.*

 20 <400> 54
 gaaggatccg ttattctag ttaatatata gttaatg 37

 25 <210> 55
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus sp.*

 30 <400> 55
 gaactgcagc tgtatgtctt tggatagagt tac 33

 35 <210> 56
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus sp.*

 40 <400> 56
 gaaggatccg gtggctttt tacttggatt ttc 33

 45 <210> 57
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus sp.*

 50 <400> 57
 gaactgcagc gacaaactca ttattgctt tgc 33

 55 <210> 58
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus sp.*

 60 <400> 58
 gaactcgagt ctacttatt tacatgg 27

 65 <210> 59
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus sp.*

 <400> 59
 gaactcgaga tagaaggcag aatagtaaca aaggattata gtggg 45

 60 <210> 60
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus sp.*

 65 <400> 60
 gtaggacct gggatagagt tacaac 27

5 <210> 61
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus sp.*

 <400> 61
 gaactcgagg cattatgtgt atcaciaaatt tggg 34

 10 <210> 62
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus sp.*

 15 <400> 62
 gaactcgaga tagaaggcag agtgggttct ggggagaaga atc 43

 <210> 63
 <211> 33
 20 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus sp.*

 <400> 63
 gaactcgagg cagccatgca ttaattattt gcc 33

 25 <210> 64
 <211> 677
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus sp.*

 30 <400> 64

ES 2 655 701 T3

Met	Lys	Ser	Asn	Leu	Arg	Tyr	Gly	Ile	Arg	Lys	His	Lys	Leu	Gly	Ala	1	5	10	15
Ala	Ser	Val	Phe	Leu	Gly	Thr	Met	Ile	Val	Val	Gly	Met	Gly	Gln	Glu	20	25	30	
Lys	Glu	Ala	Ala	Ala	Ser	Glu	Gln	Asn	Asn	Thr	Thr	Val	Glu	Glu	Ser	35	40	45	
Gly	Ser	Ser	Ala	Thr	Glu	Ser	Lys	Ala	Ser	Glu	Thr	Gln	Thr	Thr	Thr	50	55	60	
Asn	Asn	Val	Asn	Thr	Ile	Asp	Glu	Thr	Gln	Ser	Tyr	Ser	Ala	Thr	Ser	65	70	75	80
Thr	Glu	Gln	Pro	Ser	Gln	Ser	Thr	Gln	Val	Thr	Thr	Glu	Glu	Ala	Pro	85	90	95	
Lys	Thr	Val	Gln	Ala	Pro	Lys	Val	Glu	Thr	Ser	Arg	Val	Asp	Leu	Pro	100	105	110	
Ser	Glu	Lys	Val	Ala	Asp	Lys	Glu	Thr	Thr	Gly	Thr	Gln	Val	Asp	Ile	115	120	125	
Ala	Gln	Pro	Ser	Asn	Val	Ser	Glu	Ile	Lys	Pro	Arg	Met	Lys	Arg	Ser	130	135	140	
Thr	Asp	Val	Thr	Ala	Val	Ala	Glu	Lys	Glu	Val	Val	Glu	Glu	Thr	Lys	145	150	155	160
Ala	Thr	Gly	Thr	Asp	Val	Thr	Asn	Lys	Val	Glu	Val	Glu	Glu	Gly	Ser	165	170	175	
Glu	Ile	Val	Gly	His	Lys	Gln	Asp	Thr	Asn	Val	Val	Asn	Pro	His	Asn	180	185	190	
Ala	Glu	Arg	Val	Thr	Leu	Lys	Tyr	Lys	Trp	Lys	Phe	Gly	Glu	Gly	Ile	195	200	205	
Lys	Ala	Gly	Asp	Tyr	Phe	Asp	Phe	Thr	Leu	Ser	Asp	Asn	Val	Glu	Thr	210	215	220	

His	Gly	Ile	Ser	Thr	Leu	Arg	Lys	Val	Pro	Glu	Ile	Lys	Ser	Thr	Asp	225	230	235	240
Gly	Gln	Val	Met	Ala	Thr	Gly	Glu	Ile	Ile	Gly	Glu	Arg	Lys	Val	Arg	245	250	255	
Tyr	Thr	Phe	Lys	Glu	Tyr	Val	Gln	Glu	Lys	Lys	Asp	Leu	Thr	Ala	Glu	260	265	270	
Leu	Ser	Leu	Asn	Leu	Phe	Ile	Asp	Pro	Thr	Thr	Val	Thr	Gln	Lys	Gly	275	280	285	
Asn	Gln	Asn	Val	Glu	Val	Lys	Leu	Gly	Glu	Thr	Thr	Val	Ser	Lys	Ile	290	295	300	
Phe	Asn	Ile	Gln	Tyr	Leu	Gly	Gly	Val	Arg	Asp	Asn	Trp	Gly	Val	Thr	305	310	315	320
Ala	Asn	Gly	Arg	Ile	Asp	Thr	Leu	Asn	Lys	Val	Asp	Gly	Lys	Phe	Ser	325	330	335	
His	Phe	Ala	Tyr	Met	Lys	Pro	Asn	Asn	Gln	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	340	345	350	
Val	Thr	Gly	Gln	Val	Thr	Lys	Gly	Asn	Lys	Pro	Gly	Val	Asn	Asn	Pro	355	360	365	
Thr	Val	Lys	Val	Tyr	Lys	His	Ile	Gly	Ser	Asp	Asp	Leu	Ala	Glu	Ser	370	375	380	
Val	Tyr	Ala	Lys	Leu	Asp	Asp	Val	Ser	Lys	Phe	Glu	Asp	Val	Thr	Asp	385	390	395	400
Asn	Met	Ser	Leu	Asp	Phe	Asp	Thr	Asn	Gly	Gly	Tyr	Ser	Leu	Asn	Phe	405	410	415	
Asn	Asn	Leu	Asp	Gln	Ser	Lys	Asn	Tyr	Val	Ile	Lys	Tyr	Glu	Gly	Tyr	420	425	430	
Tyr	Asp	Ser	Asn	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Phe	Gln	Thr	His	Leu	Phe	Gly	435	440	445	
Tyr	Tyr	Asn	Tyr	Tyr	Tyr	Thr	Ser	Asn	Leu	Thr	Trp	Lys	Asn	Gly	Val	450	455	460	
Ala	Phe	Tyr	Ser	Asn	Asn	Ala	Gln	Gly	Asp	Gly	Lys	Asp	Lys	Leu	Lys				

ES 2 655 701 T3

465		470		475		480									
Glu	Pro	Ile	Ile	Glu	His	Ser	Thr	Pro	Ile	Glu	Leu	Glu	Phe	Lys	Ser
				485					490					495	
Glu	Pro	Pro	Val	Glu	Lys	His	Glu	Leu	Thr	Gly	Thr	Ile	Glu	Glu	Ser
			500					505					510		
Asn	Asp	Ser	Lys	Pro	Ile	Asp	Phe	Glu	Tyr	His	Thr	Ala	Val	Glu	Gly
		515					520					525			
Ala	Glu	Gly	His	Ala	Glu	Gly	Thr	Ile	Glu	Thr	Glu	Glu	Asp	Ser	Ile
	530					535					540				
His	Val	Asp	Phe	Glu	Glu	Ser	Thr	His	Glu	Asn	Ser	Lys	His	His	Ala
545					550					555					560
Asp	Val	Val	Glu	Tyr	Glu	Glu	Asp	Thr	Asn	Pro	Gly	Gly	Gly	Gln	Val
				565					570					575	
Thr	Thr	Glu	Ser	Asn	Leu	Val	Glu	Phe	Asp	Glu	Asp	Ser	Thr	Lys	Gly
			580					585					590		
Ile	Val	Thr	Gly	Ala	Val	Ser	Asp	His	Thr	Thr	Ile	Glu	Asp	Thr	Lys
		595					600					605			
Glu	Tyr	Thr	Thr	Glu	Ser	Asn	Leu	Ile	Glu	Leu	Val	Asp	Glu	Leu	Pro
	610					615					620				
Glu	Glu	His	Gly	Gln	Ala	Gln	Gly	Pro	Ile	Glu	Glu	Ile	Thr	Glu	Asn
625					630					635					640
Asn	His	His	Ile	Ser	His	Ser	Gly	Leu	Gly	Thr	Glu	Asn	Gly	His	Gly
				645					650					655	
Asn	Tyr	Gly	Val	Ile	Glu	Glu	Ile	Glu	Glu	Asn	Ser	His	Val	Asp	Ile
			660					665					670		
Lys	Ser	Glu	Leu	Gly											
		675													

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido inmunogénico aislado que comprende un dominio D de variante de la proteína A (SpA) que tiene (a) dos sustituciones de aminoácidos que interrumpen la unión a Fc; y (b) dos sustituciones de aminoácidos que interrumpen la unión a VH3; en el que para (a) la variante de SpA comprende una sustitución del resto de glicina en cada posición de aminoácido correspondiente a las posiciones de aminoácidos 9 y 10 de SEQ ID NO: 2; y para (b) la variante de SpA comprende una sustitución del resto de serina en cada posición de aminoácido correspondiente a las posiciones de aminoácido 36 y 37 de SEQ ID NO: 2.
2. El polipéptido de la reivindicación 1, que comprende además:
 - (i) una o más variantes de un dominio E, dominio A, dominio B o dominio C de SpA;
 - (ii) dos o más segmentos de dominio D; o
 - (iii) un segmento no de proteína A, preferentemente, un segundo segmento de antígeno;
 en el que el segundo segmento de antígeno es opcionalmente un segmento de antígeno estafilocócico, preferentemente, un segmento de Emp, EsxA, EsxB, EsaC, Eap, Ebh, EsaB, Coa, vWbp, vWh, Hla, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, IsdC, ClfA, ClfB y/o SasF.
3. Una composición inmunogénica que comprende un polipéptido de la reivindicación 1 o 2 en una composición farmacéuticamente aceptable.
4. La composición de la reivindicación 3, que comprende además:
 - (a) al menos un segundo antígeno estafilocócico, preferentemente, en el que el segundo antígeno se selecciona entre un péptido EsaB, Emp, EsxA, EsxB, EsaC, Eap, Ebh, Coa, vWbp, vWh, Hla, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, IsdC, ClfA, ClfB y/o SasF; o
 - (b) un adyuvante, preferentemente, en el que la variante de SpA está acoplada a un adyuvante.
5. La composición de la reivindicación 3 o 4, que comprende además un polisacárido u oligosacárido PIA; o un polisacárido u oligosacárido capsular de tipo V y/o de tipo VIII de *S. aureus*.
6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en la que el polisacárido capsular estafilocócico está conjugado con un vehículo proteico, preferentemente, en el que el vehículo proteico se selecciona del grupo que consiste en toxoide tetánico, toxoide diftérico, CRM 197, proteína D de *Haemophilus influenzae*, pneumolisina y toxoide alfa.
7. Una vacuna que comprende el polipéptido de la reivindicación 1 o 2, o la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
8. Una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia que codifica el polipéptido de la reivindicación 1 o 2.
9. Un método de fabricación de una vacuna que comprende las etapas de mezclar antígenos para preparar la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 y añadir un excipiente farmacéuticamente aceptable.
10. Una composición para su uso en la generación de una respuesta inmune contra una bacteria estafilocócica en un sujeto que comprende un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, o una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6.
11. La composición para el uso de la reivindicación 10:
 - (a) en la que al sujeto también se administra un adyuvante;
 - (b) en la que la bacteria estafilocócica es una bacteria de *S. aureus*;
 - (c) en la que la bacteria estafilocócica es resistente a uno o más tratamientos, preferentemente, en la que la bacteria estafilocócica es resistente a la meticilina;
 - (d) en la que la composición se administra más de una vez al sujeto;
 - (e) en la que la composición se administra por vía oral, parenteral, subcutánea, intramuscular o intravenosa;
 - (f) en la que la composición comprende una bacteria no estafilocócica recombinante que expresa la variante de SpA, preferentemente en la que la bacteria no estafilocócica recombinante es una *Salmonella*;
 - (g) en la que el sujeto es un mamífero, preferentemente, un ser humano;
 - (h) en la que la respuesta inmune es una respuesta inmune protectora; o
 - (i) en la que el sujeto ha desarrollado, es sospechoso de haber desarrollado o está en riesgo de desarrollar una infección estafilocócica; preferentemente en la que el sujeto es diagnosticado de una infección estafilocócica persistente.

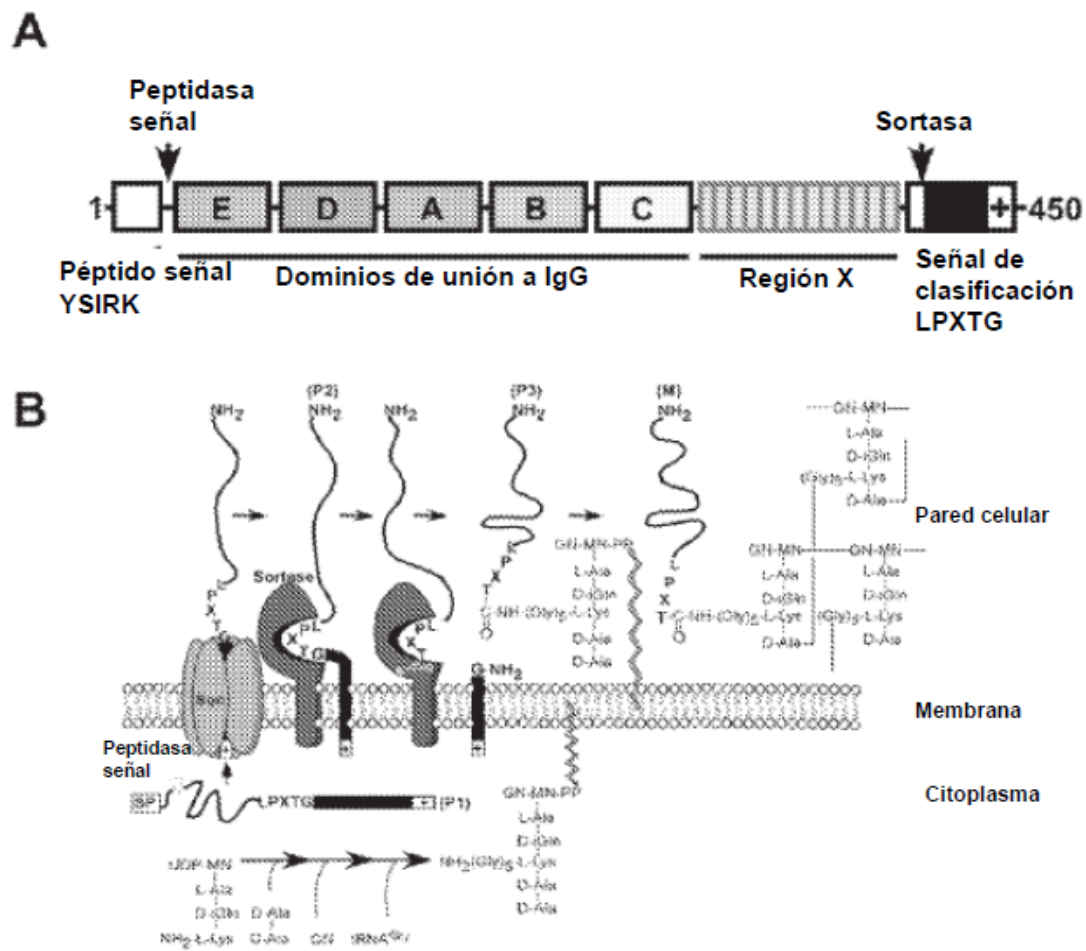


FIG 1A-1B

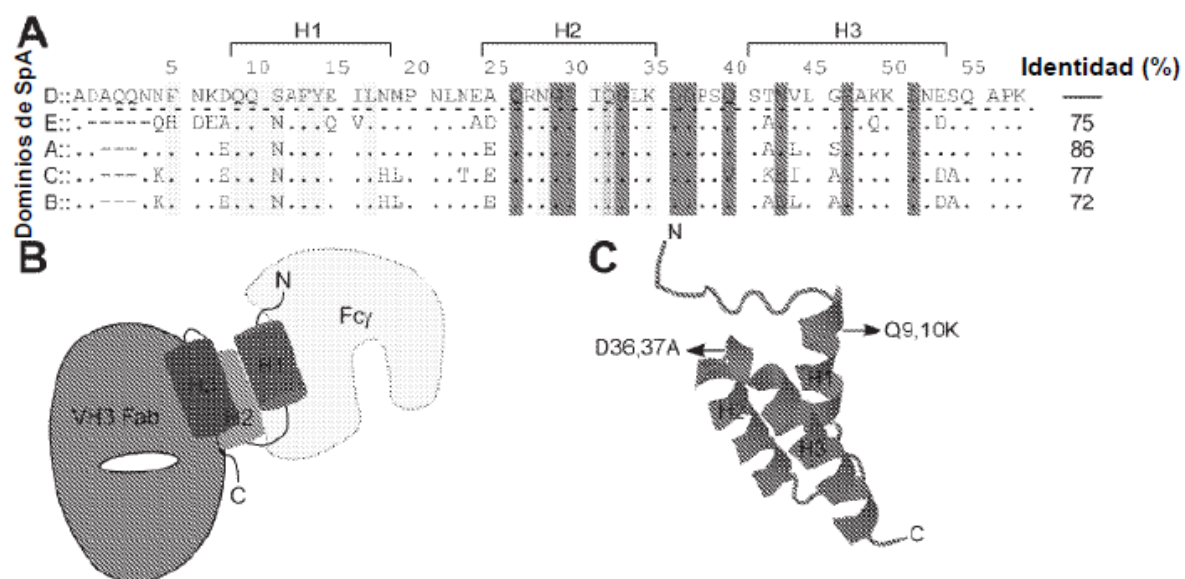


FIG. 2

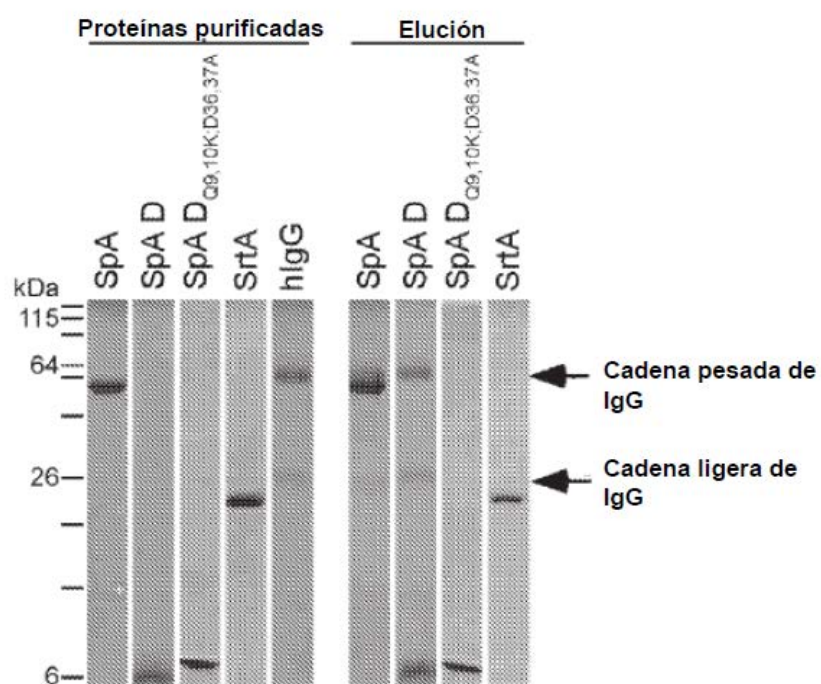


FIG. 3

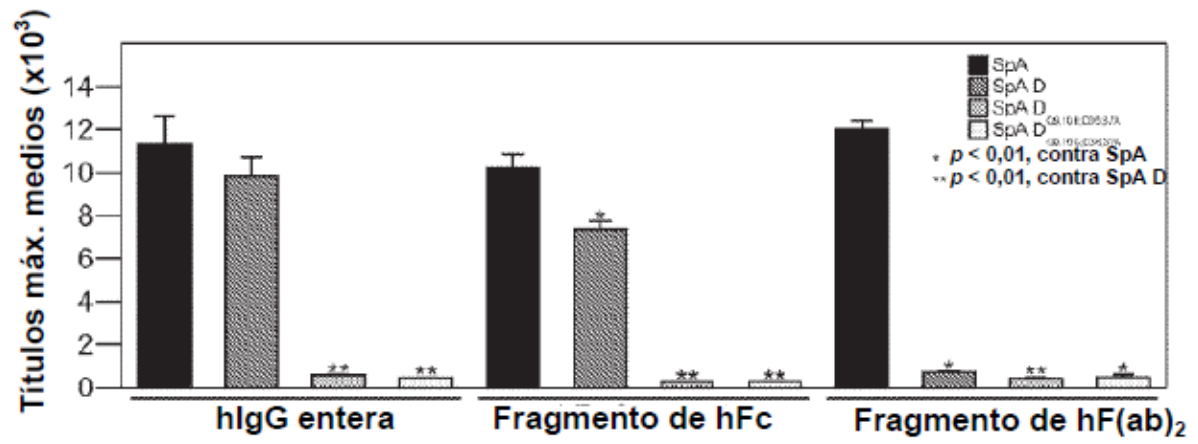


FIG. 4

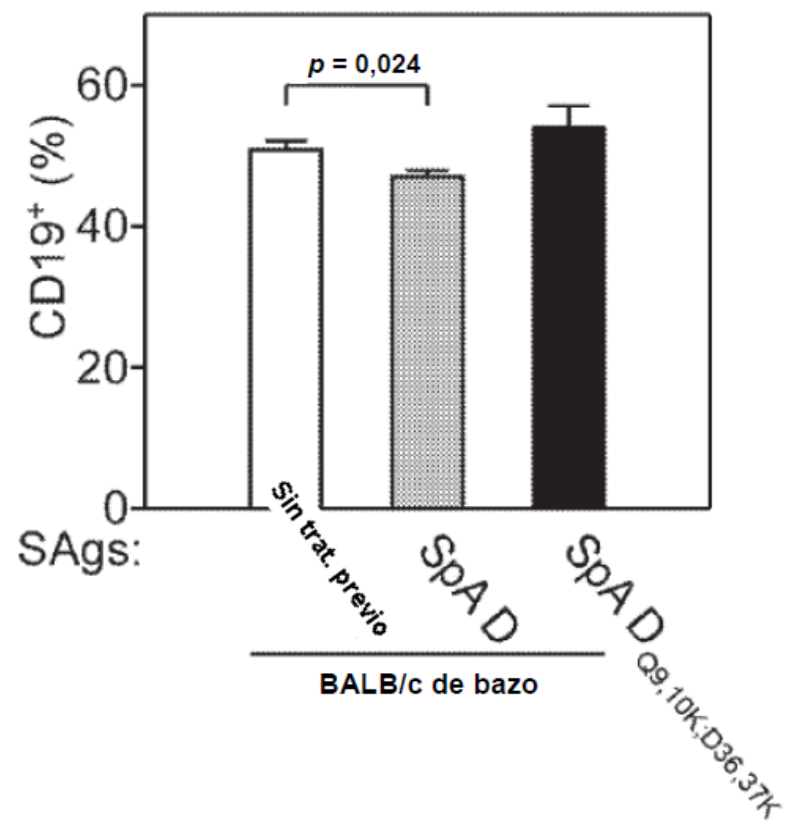


FIG. 5

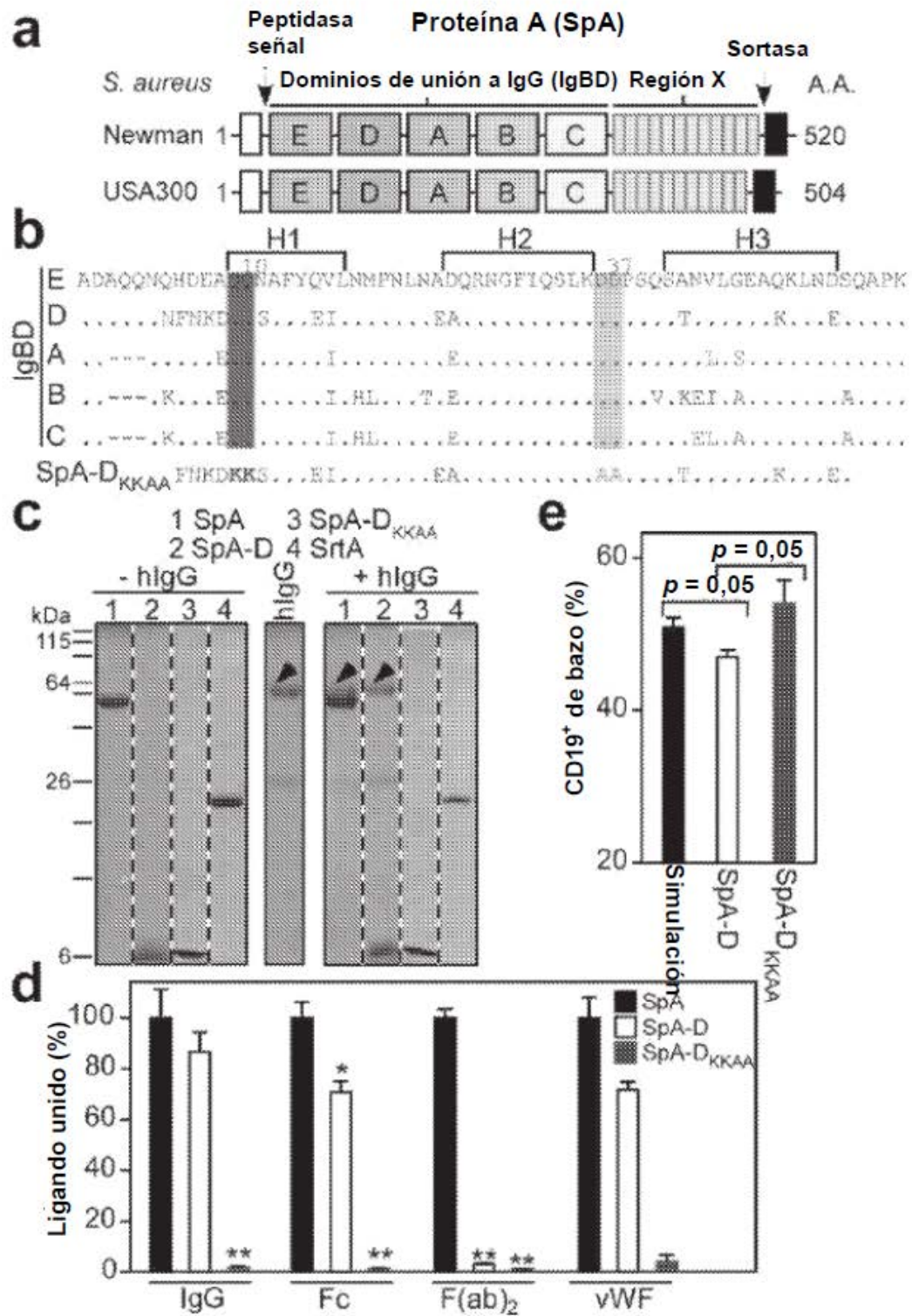


FIG. 6

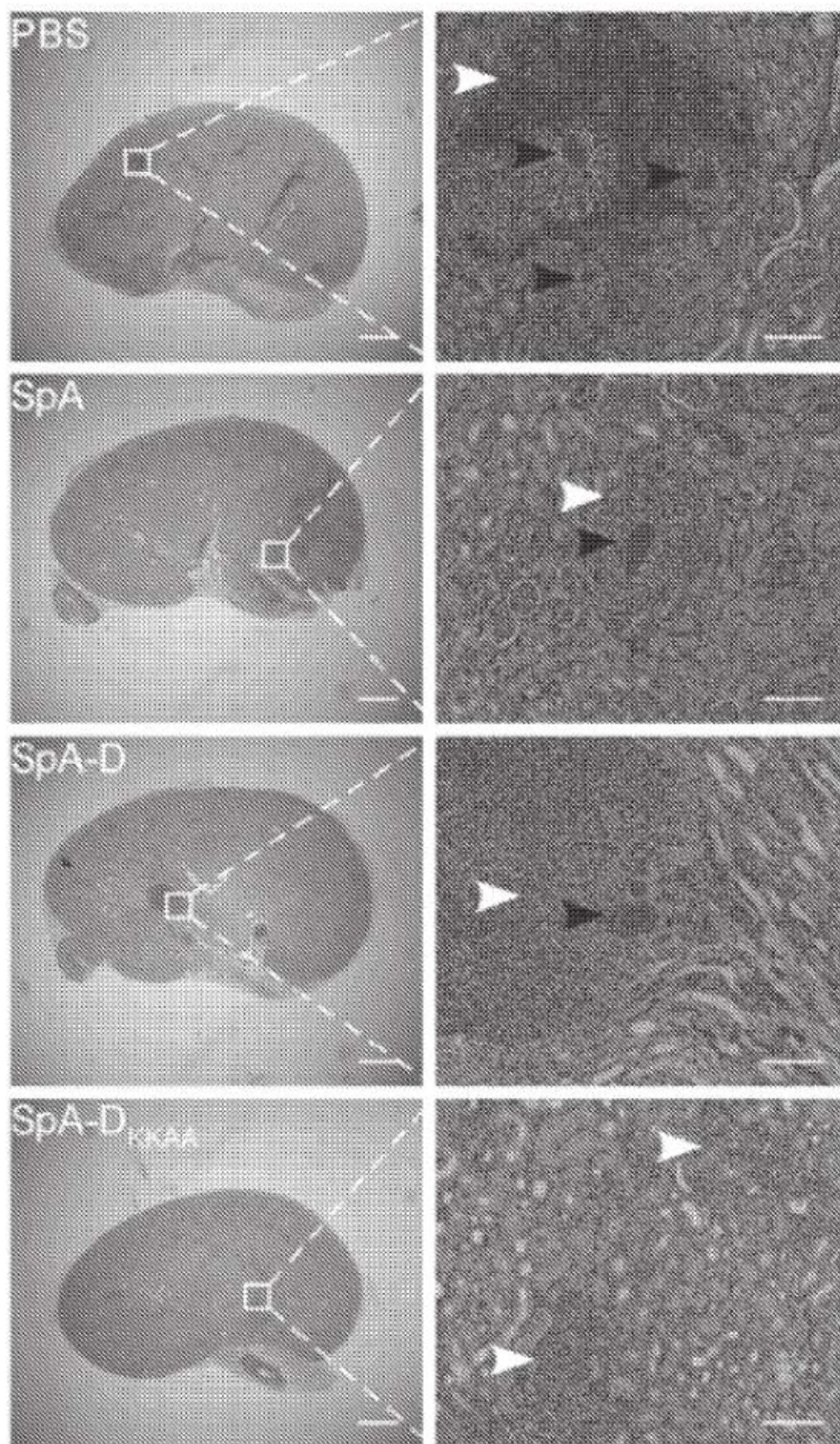


FIG. 7

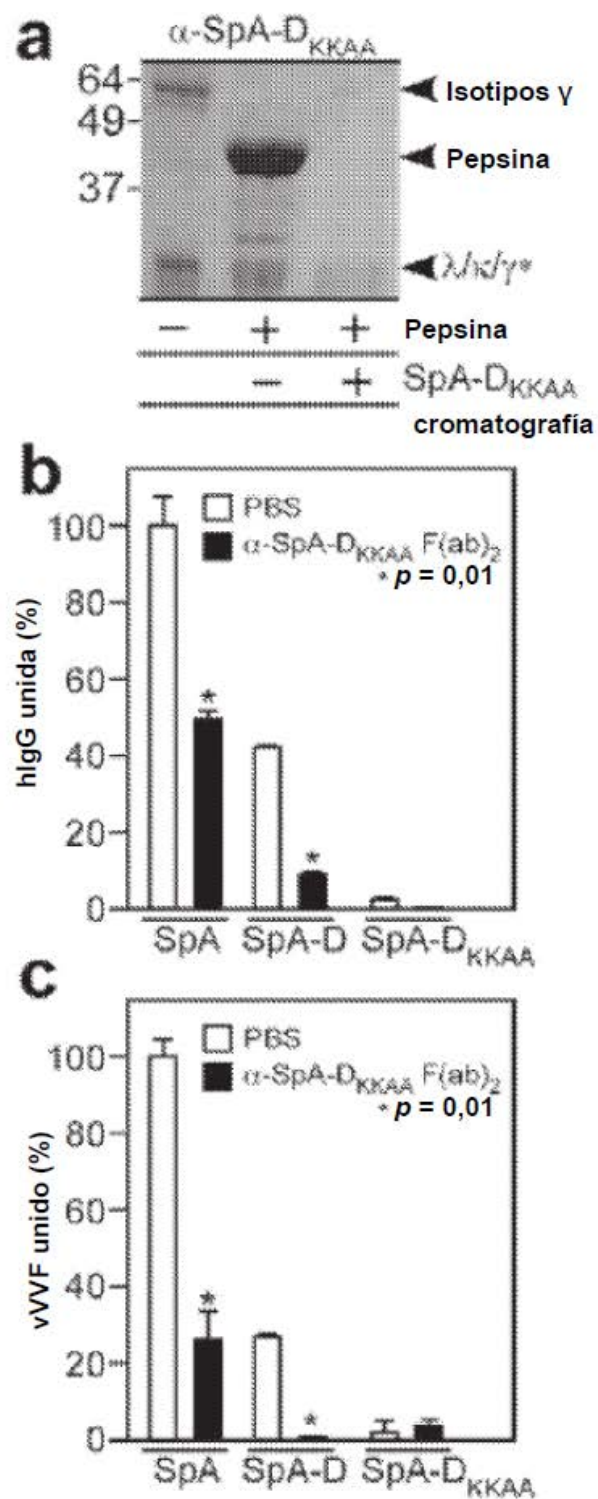


FIG. 8

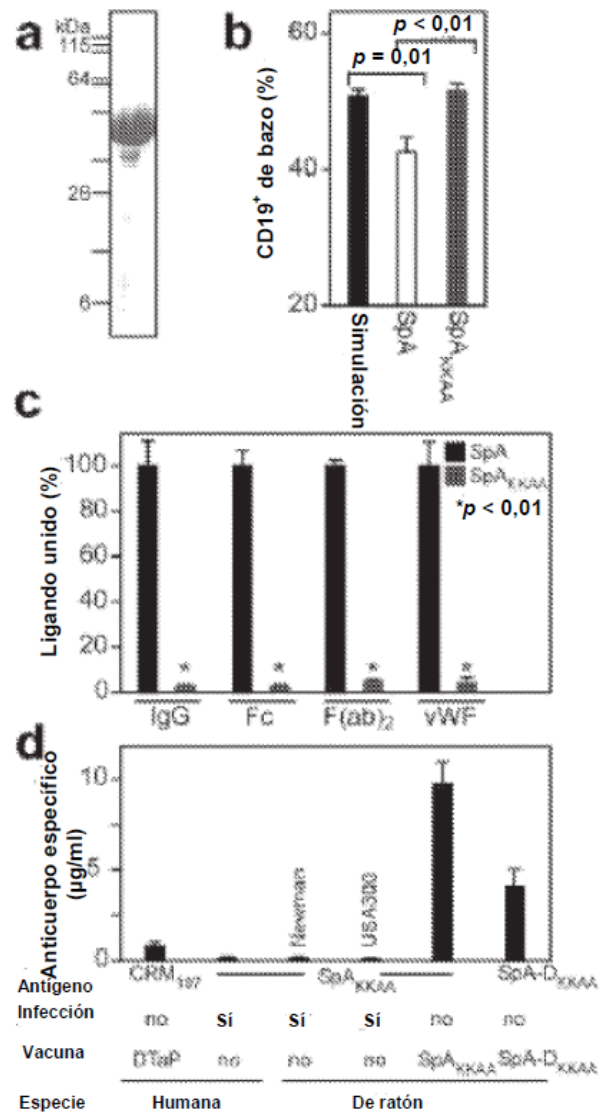


FIG. 9

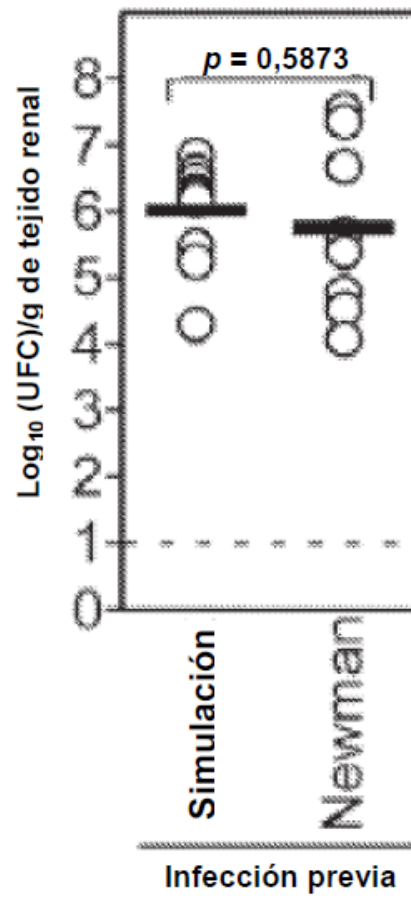


FIG. 10

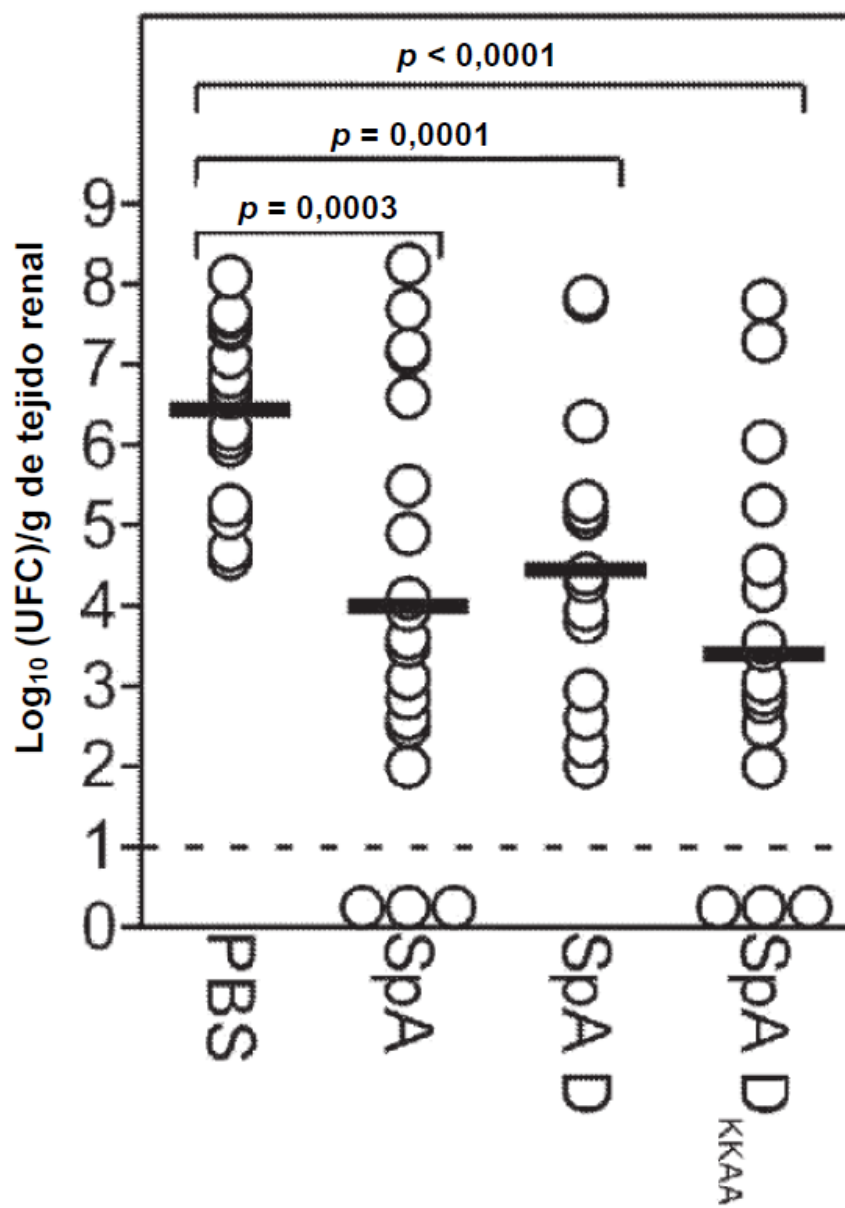


FIG. 11

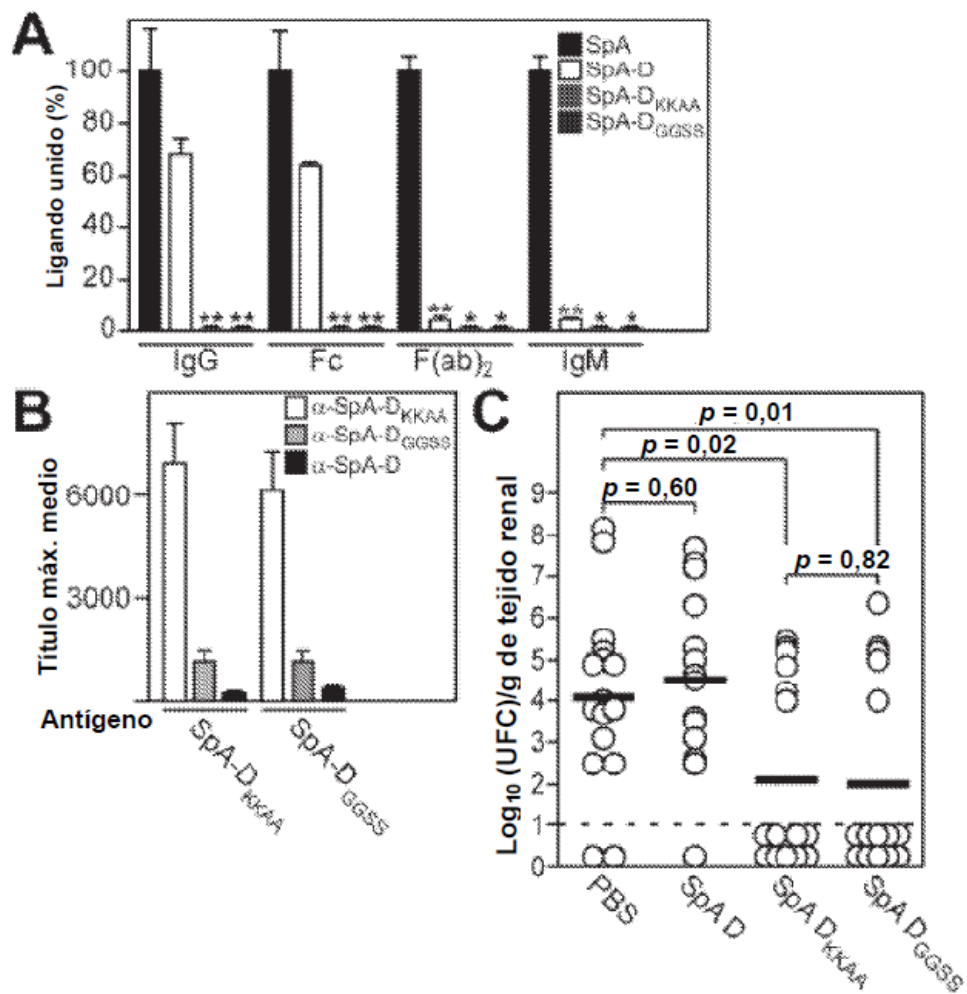


FIG. 12A-12C