SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-177191- -00000-0000

Fecha: 2011-12-22 17:19:26 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 359

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN

TITULO: COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS DE ANTÍGENOS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS REFERENCIA CRUZADA A LAS SOLICITUDES RELACIONADAS

SOLICITANTE: WYETH LLC

DIRECCIÓN: Five Giralda Farms Madison, NJ 07940 E.U.A.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 22 de Diciembre de 2011

P2011/000223

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCI.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-177191- -00000-0000
Fecha: 2011-12-22 17:19:26 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 359

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD
PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL **P2011/000223**

SOLICITUD DE:

(1)

[X] Patente de Invención. [ ] Patente de Modelo de Utilidad.

[X] Capítulo I. [ ] Capítulo II.

(2)

SOLICITANTE (71)

Nombre: WYETH LLC
Dirección: Five Giralda Farms, Madison, New Jersey, 07940
Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos
Lugar de Constitución: Estados Unidos
Teléfono: _____ **Fax:** _____
E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN
C.C. [ ] **NIT** [ ]
C.E. [ ] **Otro** [ ]
Cual _____
Número _____

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE
Dirección: Carrera 5 No. 34-03 Bogotá, Colombia
Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799
E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN
C.C. [X] **NIT** [ ]
C.E. [ ] **Otro** [ ]
Cual _____
Número 79.782.747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA.
Dirección: VER PAGINA ADJUNTA
Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA.

(5) **PCT (86)**

Solicitud Internacional No. PCT/US2010/039510 Fecha Junio 22, 2010

Publicación Internacional No. WO 2010/151544 Fecha Diciembre 29, 2010

(6) **Título (54) COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS DE ANTÍGENOS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS REFERENCIA CRUZADA A LAS SOLICITUDES RELACIONADAS**

Clasificación Internacional (51) A61K 39/085

Prioridad

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	Junio 22, 2009	61/219.134

SI [X] **NO** [ ]

(9) **Comprobante de pago No.** 11- **Fecha** Diciembre de 2011

(10) **ANEXOS**

2

[X] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

[X] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

[X] Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple. Ver expediente No. 10-030.398

[ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

[ ] Declaraciones.

[X] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

[X] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

[ ] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

[ ] Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

[ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso.

[ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

[ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

[ ] Arte final 12 x 12.

[ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o titulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

[X] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

[X] Otros. Búsqueda Internacional

(11) **FIGURA CARACTERÍSTICA:**

(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE FIRMA:

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

3

LISTA DE INVENTORES PCT/US2010/039510

ANDERSON, Annaliesa;
49 Hillcrest Drive,
Upper Saddle River, New Jersey, 07458,
UNITED STATES OF AMERICA;
Nacionalidad: UNITED KINGDOM

BAKER, Steven Morris;
64 Sunset Terrace, Highland Mills,
New York, 10930,
UNITED STATES OF AMERICA;
Nacionalidad: UNITED STATES OF AMERICA

DODGE, Ingrid Lea;
23 Grand Street, Cornwall,
New York, 12518,
UNITED STATES OF AMERICA;
Nacionalidad: UNITED STATES OF AMERICA;

GREEN, Bruce Arthur;
25 Verona Court, New City,
New York, 10956,
UNITED STATES OF AMERICA;
Nacionalidad: UNITED STATES OF AMERICA;

JANSEN, Kathrin Ute;
57 Heather Court, Allendale,
New Jersey, 07401,
UNITED STATES OF AMERICA;
Nacionalidad: GERMANY;

MURPHY, Ellen;
185 Beach Street, City Island,
New York, 10464,
UNITED STATES OF AMERICA;
Nacionalidad: UNITED STATES OF AMERICA;

NANRA, Jasdeep Singh;
195 Old Nyack Turnpike,
Chestnut Ridge, New York, 10977,
UNITED STATES OF AMERICA;
Nacionalidad: INDIA

PAVLIAK, Viliam;
17 Kevin Drive, Montebello,
New York, 10901,
UNITED STATES OF AMERICA;
Nacionalidad: UNITED STATES OF AMERICA;

RUPPEN, Mark Edward;
6 Lea Court, Garnerville,
New York, 10923,
UNITED STATES OF AMERICA;
Nacionalidad: UNITED STATES OF AMERICA

TIMOFEYEVA, Yekaterina;
139 2nd St., Mahwah,
New Jersey, 07430,
UNITED STATES OF AMERICA;
Nacionalidad: UNITED STATES OF AMERICA;

5

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 124771

Bogotá D.C., Diciembre 22 de 2011 - 16:10:13

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS NI 830.122.870

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	408396144	22/12/2011	6.281.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCION	571.000.00	571.000.00
				$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
- * -
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-177191- -00000-0000
Fecha: 2011-12-22 17:19:26 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 359

7 700037 836803

6

ESCRITURA PÚBLICA NÚMERO:

CINCO MIL CIENTO UNO (5101)

FECHA DE OTORGAMIENTO:

CUATRO (4) DE JUNIO DE DOS MIL DIEZ (2010)

NOTARIA TREINTA Y OCHO (38) DEL CÍRCULO DE BOGOTA D.C.----------

CODIGO NOTARIAL 1100100038.----------

SUPERINTENDENCIA DE NOTARIADO Y REGISTRO.----------

FORMULARIO DE CALIFICACION.----------

CLASE DE ACTO: PROTOCOLIZACION DE DOCUMENTOS.----------

PERSONAS QUE INTERVIENEN: **CARLOS REINALDO OLARTE,** identificado con cedula de ciudadanía numero 79,782,747 expedida en Bogotá D.C.----------

En la ciudad de Bogotá, Distrito Capital, Departamento de Cundinamarca, República de Colombia, a los CUATRO (04) días del mes de JUNIO de dos mil diez (2.010), ante mí EDUARDO DURAN GOMEZ. NOTARIO TREINTA Y OCHO (38E) DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C.----------

Compareció con minuta escrita el señor **CARLOS REINALDO OLARTE,** mayor de edad, con domicilio y residencia en la ciudad de Bogotá, identificado con la cedula de ciudadanía número 79,782,747 de Bogotá D.C., de estado civil Casado, con sociedad conyugal vigente, quien manifestó su propósito de celebrar el acto que define las siguientes estipulaciones: ----------

PRIMERA.- Que presenta para su Protocolización los siguientes documentos:----

1º Traducción oficial de un documento que esta originalmente en ingles contenida en cuatro (4) folios utiles y es del siguiente tenor: ----------

PODER GENERAL.- WYETH LLC.- domiciliado en Five Giralda Farms Madison, NJ 07940 United States of America.- nombramos por el presente a **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro,** nuestros, representantes legales con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales en materia de patentes, los cuales quedan a su vez facultados para representarnos ante las autoridades de cualquier jerarquía de la República de Colombia, la República de Bolivia, la República del Ecuador, la República del Perú y la República Bolivariana de Venezuela, ya sean

administrativas, judiciales o de policía, para iniciar ante dichas autoridades todas las acciones necesarias para cumplir con el objeto indicado e intervenir en todas las instancias, grados o etapas procesales; elevar y tramitar solicitudes, declaraciones y reclamos, para demandar, reconvenir, contestar demandas y reconvenciones; formular descripciones, enmiendas, oposiciones y todo tipo de impugnaciones y escritos de cualquier naturaleza; instaurar cancelaciones y amparos administrativos; abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar cualquier otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores; intervenir como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo solicitar medidas cautelares de cualquier naturaleza, conciliar, transar, someter a árbitros, desistirse de la pretensión y/o el procedimiento, allanarse a la pretensión, percibir, ratificar los actos jurídicos procesales suscritos con anterioridad al otorgamiento y/o presentación del presente poder, sustituir o delegar la presentación procesal y los demás actos que exprese la ley, con todas las demás facultades que resulten necesarias; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestro interes.- Firma: Gregg C. Benson.- Fecha: 4 MAY 2010.- Ciudad, País: GROTON, CONNECTICUT USA.----------

CERTIFICACION NOTARIAL.- En esta fecha, May 6 2010.- el Notario Público suscrito certifica: ----------

1. Que GREGG C. BENSON mayor de edad y domiciliado en EASTERN POINT ROAD, GROTON, CONNECTICUT USA suscribó el documento que antecede.-----

2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de ATTORNEY-IN-FACT de WYETH LLC.----------

3. Que WYETH LLC con sede principal ubicada en Five Giralda Farms Madison, NJ 07940 United States of America está legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y que los propósitos para los cuales se otorga el poder se encuentra dentro de los que comprenden su objeto social.----------

4. Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que está es legítima.----------

5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos 2,3 y 4 fue la exhibición de los (del) siguiente(s) documento(s) auténticado(s): Power of Attorney executed on November 16, 2009.- NOTARY PUBLIC (Signature): (Firmado).-

Nancy M. George.- My Commission Expires 30 June 2011.- (Sellado).----------

TRADUCCION OFICIAL DE UN DOCUMENTO QUE ESTA ORIGINALMENTE EN INGLES.- Sello: "El Distrito de Columbia: SS. Suscrito y juramentado ante mi, este día 7 de mayo de 2010 (firmado) Lisa Renee Johnson, Notario Públic, Distrito de Columbia.- Mi nombramiento expira el 14 de octubre de 2011.".- (Hay otra firma ilegible).- Apostilla adjunta: Distrito de Columbia.- APOSTILLA: (Convention de La Haye du 5 octobre 1961).----------

1. País: Estados Unidos de América.- El presente documento público.----------

2. Ha sido firmado por: Lisa Renee Johnson.- Notario Público en y para el Distrito de Columbia.----------

3. Actuando en calidad de: Lisa Renee Johnson, Notario Público en y para el Distrito de Columbia.----------

4. Lleva el sello/estampilla de: Certificado.----------

5. En: Washington D.C.----------

6. El: Día 7 de mayo de 2010.----------

7. Por: El Secretario del Distrito de Columbia.----------

8. Bajo el No.: 229806.----------

9. Sello / estampilla: Distrito de Columbia.- (Firmado).----------

10. Firma: Stephanie D.Scott.- Traductor Oficial.- JORGE E. SIERRA REYES.- Licencia 376-1993 Minjusticia.- MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES 160507 JORGE SIERRA CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS.- NO ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO 2010 MAY 27 A 10:17 (FIRMADO) JEFE DE LEGALIZACIONES BOGOTA D.C.----------

DISTRICT OF COLUMBIA.- APOSTILLE.- (Convention de La Haye du 5 octobre 1961).----------

1. District of Columbia United States of America.----------

2. This public document has been sogned by LISA RENEE JOHNSON.----------

3. acting on the capacity of NOTARY PUBLIC IN AND FOR THE DISTRICT OF COLUMBIA LISA RENEE JOHNSON, NOTARY PUBLIC IN AND FOR THE.-------

4. bears the seal/stamp of DISTRICT OF COLUMBIA.- CERTIFIED.----------

PAPEL DE USO EXCLUSIVO DEL PROTOCOLO NOTARIAL . NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

5. at Washington, D.C.----------

6. the 7 day of MAY 2010.----------

7. by Secretary of the District of Columbia.----------

8. No. 229806.----------

9. Seal/Stamp.----------

10. Signature.- (Firmado) Stephanie D. Scott.----------

SEGUNDA.-Que de conformidad con lo expuesto y atendiendo a las prescripciones del artículo 47 del Decreto 960 de 1970, el documento mencionado, contenidos en cuatro (4) folios útiles, quedan legalmente protocolizados ante el Notario Treinta y Ocho (38) del Círculo Bogotá, de manera que desde ahora quedan bajo su custodia y guarda para que surtan los efectos legales a que haya lugar y los interesados puedan consultarlos y obtener las copias que de el solicite.-

---------- HASTA AQUÍ EL CONTENIDO -DE LA MINUTA ----------

SE ADVIRTIÓ al (a los) otorgante (s) de esta Escritura de la **obligación que tiene (n) de leer la totalidad de su texto,** a fin de verificar la exactitud de todos los datos en ella consignados con el fin de aclarar, modificar o corregir lo que le(s) pareciere; la firma de la misma demuestra su aprobación total del texto. ----------

Se advierte igualmente la necesidad de diligenciar los espacios en blanco correspondientes a la información personal y de trabajo consignados en el espacio destinado para la firma de los suscriptores del instrumento publico, con el objeto de confrontar la información solicitada con el contenido de la escritura previo a la autorización de la misma. ----------

En consecuencia, la notaria no asume ninguna responsabilidad por error o inexactitudes establecidas con posterioridad a la firma del (los) otorgante (s) y del notario. ----------

En tal caso, de la existencia de estos, deben ser corregidos mediante el otorgamiento de una nueva escritura, suscrita por el (los) que intervino (eron) en la inicial y sufragada por el (ellos) mismo (s). (Articulo 35 decreto ley 960 de 1.970).----------

ADVERTENCIA PARA TODOS LOS COMPARECIENTES QUE EXTIENDAN Y OTORGUEN INSTRUMENTOS, SEGÚN ART. 34 C.N., LEY 190 DE 1995,

8

LEY 333 DE 1996 Y LEY 365 DE 1997. Los comparecientes bajo la gravedad del juramento manifiestan clara y expresamente que todos los dineros, bienes muebles e inmuebles contenidos en este instrumento fueron adquiridos por medios y actividades licitas. Asi como el dinero con el que se efectúa el pago de lós gastos notariales. --

OTORGAMIENTO Y AUTORIZACIÓN. LEÍDO EL PRESENTE INSTRUMENTO POR EL OTORGANTE Y ADVERTIDO DE SU REGISTRO DENTRO DEL TÉRMINO DE LEY, ESTUVO DE ACUERDO CON ÉL LO ACEPTÓ EN LA FORMA COMO ESTÁ REDACTADO Y EN TESTIMONIO DE QUE LE DA SU ASENTIMIENTO Y APROBACIÓN LO FIRMA POR ANTE MÍ Y CONMIGO EL NOTARIO QUE DE TODO LO EXPUESTO DOY FE Y POR ELLO LO AUTORIZO.--

CONSTANCIA: EL PRESENTE INSTRUMENTO SE EXTIENDE EN LAS SIGUIENTES HOJAS DE PAPEL NOTARIAL Nos.
/ /UU03/ 836803/ 836810/ 83682// --

DERECHOS NOTARIALES: RESOLUCIÓN No. 10301 DEL 17 DE DICIEMBRE DE 2.009. $ 42.860 --

CARLOS REINALDO OLARTE
C. C. No. 79782747 de Bogotá
ESTADO CIVIL: CASADO
DIRECCIÓN RESIDENCIA:
DIRECCIÓN OFICINA: Diagonal 34 No 5-28
TELEFONO RESIDENCIA:
TELEFONO OFICINA: 601-7700
CELULAR: 315 7901625

EL(LA) NOTARIO (A) TREINTA Y OCHO (38)

DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C.

EDUARDO DURAN GOMEZ.

S.S.



YanethG/201005163

Traducción oficial de un documento que está originalmente en inglés

Sello: "El Distrito de Columbia: SS. Suscrito y juramentado ante mí, este día 7 de mayo de 2010 (firmado) Lisa Renee Johnson, Notario Públic, Distrito de Columbia. Mi nombramiento expira el 14 de octubré de 2011."

(Hay otra firma ilegible).

Apostilla adjunta:

Distrito de Columbia	
APOSTILLA:	
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)	
1. País:	Estados Unidos de América
El presente documento público	
2. Ha sido firmado por:	Lisa Renee Johnson
3. Actuando en calidad de:	Notario Público en y para el Distrito de Columbia
4. Lleva el sello/estampilla de:	Lisa Renee Johnson, Notario Público en y para el Distrito de Columbia
Certificado	
5. En:	Washington D.C.
6. El:	Día 7 de mayo de 2010
7. Por:	El Secretario del Distrito de Columbia
8. Bajo el No.:	229806
9. Sello / estampilla:	Distrito de Columbia
10. Firma:	(Firmado) Stephanie D. Scott.

Fin de traducción

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Miami-Dade

MINISTERIO DE
RELACIONES
EXTERIORES

160507

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

2010 MAY 27 A 10:17

JEFE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

10

Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. *District of Columbia*
   United States of America
2. This public document has been signed by LISA RENEE JOHNSON
3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC IN AND FOR THE DISTRICT OF COLUMBIA
4. bears the seal/stamp of LISA RENEE JOHNSON, NOTARY PUBLIC IN AND FOR THE DISTRICT OF COLUMBIA

CERTIFIED

5. at Washington, D.C.
6. the 7 day of MAY 2010
7. by *Secretary of the District of Columbia*
8. No. 229806
9. Seal/Stamp

86 - PO133

10. Signature

Stephanie D. Scott

OLARTERAISBECK
OLARTE RAISBECK MOURE & CASTRO LTDA.

Carlos R. Olarte
J. Ian Raisbeck
Juan Guillermo Moure
Natalia Castro

Alexander Agudelo
Ángela Cocora
Erika Rico
Carlos A. Parra
Gina Arias
Juan Felipe Acosta
Andrés Rincón
Mariana Franco
Monica Guevara
Alvaro Sabbagh

Of Counsel
Guillermo Chahin
Graciela Melo
Jacqueline Chaparro
Cruz E. de Moncaleano

The undersigned **General Power**

El suscrito, **Poder General**

WYETH LLC

domiciled in

domiciliado en

Five Giralda Farms Madison, NJ 07940 United States of America

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro** , legal representatives with faculties to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents in patent matters, who at the same time have the faculty to represent us before the administrative, judicial or police authorities of any hierarchy of the Republic of Colombia, the Republic of Bolivia, the Republic of Ecuador, the Republic of Peru, and the Bolivarian Republic of Venezuela, to initiate before said authorities all the necessary actions to accomplish said purposes and to intervene in all instances, grades and procedural levels; to file and prosecute applications, declarations, complaints, to claim, counterclaim, answer claims and counterclaims; to draw up specifications; to make amendments; oppositions and all types of objections and writings of any nature; cancellations and administrative injunction proceedings; to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive documents and monies; act as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to request preliminary injunctions of any nature, settle, make arrangements, to submit to arbitrators, to desist from claims or procedures, to accept claims, to collect, to ratify legal proceedings subscribed before the appointment and/or presentation of this Power, substitute or delegate the legal representation and other acts prescribed by law, in short, with all such further powers as may be required; to comply with all other requirements and, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests.

nombramos por el presente a **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro.** nuestros representantes legales con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales en materia de patentes, los cuales quedan a su vez facultados para representarnos ante las autoridades de cualquier jerarquía de la República de Colombia, la República de Bolivia, la República del Ecuador, la República del Perú y la República Bolivariana de Venezuela, ya sean administrativas, judiciales o de policía, para iniciar ante dichas autoridades todas las acciones necesarias para cumplir con el objeto indicado e intervenir en todas las instancias, grados o etapas procesales; elevar y tramitar solicitudes, declaraciones y reclamos, para demandar, reconvenir, contestar demandas y reconvenciones; formular descripciones, enmiendas, oposiciones y todo tipo de impugnaciones y escritos de cualquier naturaleza; instaurar cancelaciones y amparos administrativos; abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar cualquier otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores; intervenir como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo solicitar medidas cautelares de cualquier naturaleza, conciliar, transar, someter a árbitros, desistirse de la pretensión y/o el procedimiento, allanarse a la pretensión, percibir, ratificar los actos jurídicos procesales suscritos con anterioridad al otorgamiento y/o presentación del presente poder, sustituir o delegar la representación procesal y los demás actos que exprese la ley, con todas las demás facultades que resulten necesarias; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses.

Signature/Firma: Gregg C. Benson
Attorney-in-Fact

Date/Fecha: 4 MAY 2010

City,Country/Ciudad,País: GROTON, CONNECTICUT USA

5/7 Colombia NC

P12612

OLARTERAISBECK
OLARTE RAISBECK MOURE & CASTRO LTDA.

MODEL OF NOTARIAL CERTIFICATION

Notarial Certification	**Certificación Notarial**
On this date, May 6, 2010	En esta fecha,
The undersigned Notary Public certifies:	el Notario Público suscrito certifica:
1. That GREGG C. BENSON of legal age and domiciled in EASTERN POINT ROAD, GROTON, CONNECTICUT USA signed the foregoing document.	1. Que mayor de edad y domiciliado suscribió el documento que antecede.
2. That the grantor has executed the foregoing document as ATTORNEY-IN-FACT of WYETH LLC	2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de de
3. That WYETH LLC having its principal place of business located in Five Giralda Farms Madison, NJ 07940 United States of America is duly incorporated, is currently in existence, and that the purposes for which the General Power is granted are within the scope of its corporate purposes.	4. Que con sede principal ubicada en está legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y que los propósitos para los cuales se otorga el poder se encuentra dentro de los que comprenden su objeto social.
4. That the grantor has the authority to execute the General Power and that his/her representation is legal.	4. Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que ésta es legitima.
5. The foundation for my certifications contained in points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following authentic document(s): Power of Attorney executed on November 16, 2009	5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s):

NOTARY PUBLIC (Signature): Nancy M George
Nancy M. George

NANCY M. GEORGE
Notary Public
My Commission Expires 30 June 2011

The District of Columbia: SS
subscribed and sworn to before me
this 1st day of December 2010

Lisa Renee Johnsen
Notary Public, DC
My commission expires 10/14/2011

TERCERA (3) COPIA (FOTOCOPIA) DE LA

ESCRITURA No. 5101 DE FECHA CUATRO DEL MES

DE JUNIO DE 2010 TOMADA DE SU ORIGINAL

CONFORME AL ART. 41 DEL DECRETO 2148 DE 1983, QUE SE EXPIDE EN

BOGOTA D.C., A OCHO DEL MES DE JUNIO

DE DOS MIL DIEZ (2010), EN SIETE

(07) FOLIOS UTILES CON DESTINO A: EL INTERESADO

EDUARDO DURAN GOMEZ

NOTARIO TREINTA Y OCHO (38)

REPUBLICA DE COLOMBIA
NOTARIA 38 DE BOGOTA, D.C.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
29 December 2010 (29.12.2010)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2010/151544 A1

(51) International Patent Classification:
A61K 39/085 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2010/039510

(22) International Filing Date:
22 June 2010 (22.06.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/219,134 22 June 2009 (22.06.2009) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **WYETH LLC** [US/US]; Five Giralda Farms, Madison, New Jersey 07940 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **ANDERSON, Annaliesa** [US/US]; 49 Hillcrest Drive, Upper Saddle River, New Jersey 07458 (US). **PAVLIAK, Viliam** [US/US]; 17 Kevin Drive, Montebello, New York 10901 (US). **JANSEN, Kathrin, Ute** [DE/US]; 57 Heather Court, Allendale, New Jersey 07401 (US). **DODGE, Ingrid, Lea** [US/US]; 23 Grand Street, Cornwall, New York 12518 (US). **BAKER, Steven, Morris** [US/US]; 64 Sunset Terrace, Highland Mills, New York 10930 (US). **NANRA, Jasdeep, Singh** [IN/US]; 195 Old Nyack Turnpike, Chestnut Ridge, New York 10977 (US). **MURPHY, Ellen** [US/US]; 185 Beach Street, City Island, New York 10464 (US). **GREEN, Bruce, Arthur** [US/US]; 25 Verona Court, New City, New York 10956 (US). **RUPPEN, Mark, Edward** [US/US]; 6 Lea Court, Garnerville, New York 10923 (US). **TIMOFEYEVA, Yekaterina** [US/US]; 139 2nd St., Mahwah, New Jersey 07430 (US).

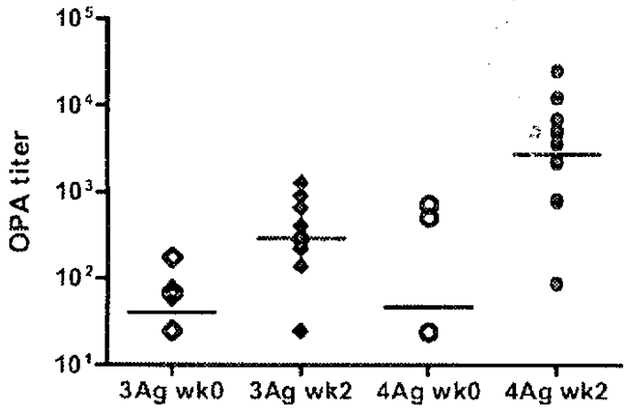
(74) Agents: **RUSKIN, Barbara, A.** et al.; Ropes & Gray LLP, 1211 Avenue of the Americas, New York, New York 10036 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[Continued on next page]

(54) Title: IMMUNOGENIC COMPOSITIONS OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS ANTIGENS

FIGURE 20



(57) Abstract: The present invention relates to immunogenic compositions, comprising polypeptides and polysaccharides from Staphylococcus aureus. The present invention also relates to immunogenic compositions, comprising Staphylococcus aureus capsule polysaccharides conjugated to a carrier protein. In addition, the invention relates to methods of inducing an immune response in subjects against Staphylococcus aureus using immunogenic compositions of the Staphylococcus aureus polypeptides and capsule polysaccharides.

WO 2010/151544 A1

(84) **Designated States** *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— *with international search report (Art. 21(3))*

— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

IMMUNOGENIC COMPOSITIONS OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ANTIGENS

CROSS REFERENCE TO RELATED APPLICATION

[0001] This application claims the priority benefit of U.S. Provisional Patent Application No. 61/219,134, filed June 22, 2009, the entirety of which is hereby incorporated by reference herein.

FIELD OF THE INVENTION

[0002] The present invention relates to immunogenic compositions, comprising polypeptides and capsular polysaccharides isolated from *Staphylococcus aureus*. In addition, the invention relates to methods of inducing an immune response in subjects against *Staphylococcus aureus* using immunogenic compositions of the *Staphylococcus aureus* polypeptides, and capsular polysaccharides. The resulting antibodies can also be used to treat or prevent *Staphylococcus aureus* infection via passive immunotherapy.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0003] Humans are the natural reservoirs for *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Healthy individuals can be colonized by *S. aureus* on the skin, in the nares and the throat either persistently (10-35%), intermittently (20-75%) or be in a non-carriage state (5-70%) with no associated disease. See Vandenbergh et al., *J. Clin. Micro.* 37:3133-3140 (1999). Disease subsequently occurs when individuals become immunocompromised due to breaches in immune barriers, such as during surgery,

placement of indwelling catheters or other devices, trauma, or wounds. The resulting *S. aureus* infection can cause a wide range of different diseases that range from mild skin infections to endocarditis, osteomyelitis, bacteremia, sepsis, and other forms of disease with accompanying high mortality rates. The large human reservoir enhances opportunity for evolution and spread of adapted pathogenic clonal types.

[0004] Invasive staphylococcal infections from the Gram positive cocci *S. aureus* and *S. epidermidis* are of particular concern because they are an increasing public health problem worldwide. Specifically, *S. aureus* is responsible for the majority of hospital-acquired (nosocomial) infections and its prevalence in community-onset infections is increasing. For example, the incidence of invasive methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) was estimated at 31.8 per 100,000 persons, including 18,650 deaths in the United States in 2005. See Klevens R.M. et al., *JAMA*, 298:1763-71 (2007).

[0005] Staphylococcal diseases have seen a dramatic increase in the last 20 years, this increase parallels the use of intravascular devices and invasive procedures. This rise in disease incidence is made more troubling because of the parallel rise of antibiotic resistance, therefore, there is an urgent need for immunogenic compositions for use in vaccines or to elicit polyclonal or monoclonal antibodies to confer passive immunity as a means to prevent or treat staphylococcal infection and associated diseases.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0006] The present invention is directed towards a multi-antigen or multicomponent immunogenic composition comprising at least three antigens isolated from a staphylococcal bacterium. The antigens, which are polypeptides and polysaccharides, may be obtained, *inter alia*, directly from the bacterium using isolation procedures known to those skilled in the art, or they may be produced using synthetic protocols, or they may be recombinantly produced using genetic engineering procedures also known to those skilled in the art, or through a combination of any of the foregoing. In certain embodiments, an immunogenic composition of the invention comprises three or more antigens selected from an isolated *S. aureus* clumping factor A (ClfA) polypeptide, an isolated *S. aureus*

clumping factor B (ClfB) polypeptide, an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 5 (CP5) conjugated to a carrier protein, an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 8 (CP8) conjugated to a carrier protein and an isolated *S. aureus* MntC protein. In addition, the present invention provides methods for inducing an immune response against a staphylococcal bacterium, methods for preventing, reducing the severity, or delaying onset of a disease caused by a staphylococcal bacterium, and methods for preventing, reducing the severity, or delaying onset of at least one symptom of a disease caused by infection with a staphylococcal bacterium.

[0007] Accordingly, in one embodiment, the invention provides an immunogenic composition comprising: an isolated *S. aureus* clumping factor A (ClfA) polypeptide, an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 5 (CP5) conjugated to a carrier protein, and an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 8 (CP8) conjugated to a carrier protein.

[0008] In one embodiment, the invention provides an immunogenic composition comprising: an isolated *S. aureus* clumping factor A (ClfA) polypeptide, an isolated *S. aureus* clumping factor B (ClfB), an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 5 (CP5) conjugated to a carrier protein, and an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 8 (CP8) conjugated to a carrier protein.

[0009] In one embodiment, the invention provides an immunogenic composition comprising: an isolated *S. aureus* clumping factor A (ClfA) polypeptide, an isolated *S. aureus* clumping factor B (ClfB) polypeptide, an isolated *S. aureus* MntC protein, an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 5 (CP5) conjugated to a carrier protein, and an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 8 (CP8) conjugated to a carrier protein.

[0010] In one embodiment, the invention provides an immunogenic composition comprising: an isolated *S. aureus* clumping factor A (ClfA) polypeptide, an isolated *S. aureus* MntC protein, an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 5 (CP5) conjugated to a carrier protein, and an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 8 (CP8) conjugated to a carrier protein.

[0011] In one embodiment, the invention provides an immunogenic composition comprising: an isolated *S. aureus* clumping factor B (ClfB) polypeptide, an

isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 5 (CP5) conjugated to a carrier protein, and an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 8 (CP8) conjugated to a carrier protein.

[0012] In one embodiment, the invention provides an immunogenic composition comprising: an isolated *S. aureus* clumping factor B (ClfB) polypeptide, an isolated *S. aureus* MntC protein, an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 5 (CP5) conjugated to a carrier protein, and an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 8 (CP8) conjugated to a carrier protein.

[0013] In one embodiment, the invention provides an immunogenic composition comprising: an isolated *S. aureus* clumping factor A (ClfA) polypeptide, an isolated *S. aureus* clumping factor B (ClfB) polypeptide, and an isolated *S. aureus* MntC protein.

[0014] In one embodiment, the invention provides an immunogenic composition comprising: an isolated *S. aureus* MntC protein, an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 5 (CP5) conjugated to a carrier protein, and an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 8 (CP8) conjugated to a carrier protein.

[0015] In one embodiment, the immunogenic composition comprises an isolated ClfA polypeptide fragment, wherein the ClfA polypeptide fragment comprises the fibrinogen binding domain of ClfA. In one embodiment, the ClfA polypeptide fragment comprises a fibrinogen binding domain comprising the N1, N2 and N3 domains of ClfA. In one embodiment, the ClfA polypeptide fragment comprises a fibrinogen binding domain comprising the N2 and N3 domains of ClfA. In one embodiment, the compositions containing the ClfA fibrinogen binding domain display reduced binding to fibrinogen. In one embodiment, the fibrinogen binding domain of ClfA binds to fibrinogen at a reduced level compared to the binding observed to fibrinogen with the native fibrinogen binding domain of ClfA. In one embodiment, the compositions containing the ClfA fibrinogen binding domain display reduced binding to fibrinogen and have an amino acid substitution at one or more of Tyr 338, Tyr 256, Pro 336, Lys 389, Ala 254 and Ile 387 of the full length protein containing the signal sequence. In one embodiment, the compositions containing the ClfA fibrinogen binding domain display an amino acid substitution at one or more of Tyr 338, Tyr 256, Pro 336, Lys 389, Ala 254 and Ile 387,

wherein the amino acid at any one or more of these positions is changed to an Ala or Ser. In one embodiment, the composition comprises a ClfA fibrinogen binding domain wherein the Tyr at position 338 is changed to an Ala.

[0016] In one embodiment, the immunogenic composition comprises an isolated ClfB polypeptide fragment, wherein the ClfB polypeptide fragment comprises the fibrinogen binding domain of ClfB. In one embodiment, the ClfB polypeptide fragment comprises a fibrinogen binding domain comprising the N1, N2 and N3 domains of ClfB. In one embodiment, the ClfB polypeptide fragment comprises a fibrinogen binding domain comprising the N2 and N3 domains of ClfB. In one embodiment, the compositions containing the ClfB fibrinogen binding domain display reduced binding to fibrinogen. In one embodiment, the fibrinogen binding domain of ClfB binds to fibrinogen at a reduced level compared to the binding observed to fibrinogen with the native fibrinogen binding domain of ClfB.

[0017] In one embodiment, the immunogenic composition comprises *S. aureus* capsular polysaccharide type 5 (CP5) which is a high molecular weight polysaccharide of between 20 and 1000 kDa. In one embodiment, the type 5 high molecular weight polysaccharide has a molecular weight of between 50 and 300 kDa. In one embodiment, the type 5 high molecular weight polysaccharide has a molecular weight of between 70 and 150 kDa.

[0018] In one embodiment, the immunogenic composition comprises an *S. aureus* capsular polysaccharide type 5, which is between 10% and 100% O-acetylated. In one embodiment, the immunogenic composition comprises an *S. aureus* capsular polysaccharide type 5, which is between 50% and 100% O-acetylated. In one embodiment, the immunogenic composition comprises an *S. aureus* capsular polysaccharide type 5, which is between 75% and 100% O-acetylated.

[0019] In one embodiment, the immunogenic composition comprises *S. aureus* capsular polysaccharide type 8 which is a high molecular weight polysaccharide of between 20 and 1000 kDa. In one embodiment, the type 8 high molecular weight polysaccharide has a molecular weight of between 50 and 300 kDa. In one embodiment, the type 8 high molecular weight polysaccharide has a molecular weight of between 70 and 150 kDa.

[0020] In one embodiment, the immunogenic composition comprises an *S. aureus* capsular polysaccharide type 8, which is between 10% and 100% O-acetylated. In one embodiment, the immunogenic composition comprises an *S. aureus* capsular polysaccharide type 8, which is between 50% and 100% O-acetylated. In one embodiment, the immunogenic composition comprises an *S. aureus* capsular polysaccharide type 8, which is between 75% and 100% O-acetylated.

[0021] In one embodiment, the capsular polysaccharide 5 and/or 8 present in an immunogenic composition is conjugated to a carrier protein. In one embodiment, the carrier protein is the *Corynebacterium diphtheriae* (*C. diphtheriae*) toxoid CRM_{197}.

[0022] In one embodiment, the immunogenic composition comprises the *S. aureus* MntC, which is a lipidated protein. In one embodiment, the immunogenic composition comprises the *S. aureus* MntC, which is not a lipidated protein.

[0023] In one embodiment, the invention provides an immunogenic composition as described herein, further comprising at least one protein from the serine-aspartate repeat (Sdr) protein family selected from the group consisting of SdrC, SdrD and SdrE.

[0024] In one embodiment, the invention provides an immunogenic composition as described herein, further comprising the iron surface determinant B (IsdB) protein.

[0025] In each of the embodiments described herein in which an immunogenic composition comprises three or more recited antigens, that composition may further comprise other immunogenic and/or non-immunogenic substances. In certain embodiments, each immunogenic composition may, alternatively, "consist essentially of" or "consist of" the three or more recited antigens and further comprise one or more non-immunogenic substances, as described in more detail herein.

[0026] In one embodiment, the invention provides an immunogenic composition as described herein, further comprising any one of the following antigens: Opp3a, DltD, HtsA, LtaS, IsdA, IsdC, SdrF, SdrG, SdrH, SrtA, SpA, Sbi FmtB, alpha-

hemolysin (hla), beta-hemolysin, fibronectin-binding protein A (fnbA), fibronectin-binding protein B (fnbB), coagulase, Fig, map, Panton-Valentine leukocidin (pvl), alpha-toxin and its variants, gamma-toxin (hlg) and variants, ica, immunodominant ABC transporter, Mg2+ transporter, Ni ABC transporter, RAP, autolysin, laminin receptors, IsaA/PisA, IsaB/PisB , SPOIIIE, SsaA, EbpS, Sas A, SasF, SasH, EFB (FIB), SBI, Npase, EBP, bone sialo binding protein II, aureolysin precursor (AUR)/Scpp1, Cna, and fragments thereof such as M55, TSST-1, mecA, poly-N-acetylglucosamine (PNAG/dPNAG) exopolysaccharide, GehD, EbhA, EbhB, SSP-1, SSP-2, HBP, vitronectin binding protein, HarA, EsxA, EsxB, Enterotoxin A, Enterotoxin B, Enterotoxin C1, and novel autolysin. In certain embodiments of the invention, when the immunogenic composition comprises certain forms of CP5 and/or CP8, it may not further comprise PNAG.

[0027] In one embodiment, the immunogenic composition further comprises an adjuvant. In one embodiment, the immunogenic composition further comprises a pharmaceutically acceptable carrier.

[0028] In one embodiment, the immunogenic composition is used to formulate a vaccine. In one embodiment, the vaccine is used to induce an immune response in a subject against *S. aureus*. In one embodiment, the immunogenic composition is used to generate an antibody formulation to confer passive immunity on a subject.

[0029] In one embodiment, the invention provides a method of inducing an immune response against *S. aureus* comprising administering to a subject an immunogenic amount of any of the immunogenic compositions described herein and a pharmaceutically acceptable carrier.

[0030] In one embodiment, the invention provides a method of preventing or reducing infection with *S. aureus*, or a method of preventing or reducing the severity of at least one symptom associated with an infection caused by *S. aureus*, the methods comprising administering to a subject an immunogenic amount of any of the immunogenic compositions described herein and a pharmaceutically acceptable carrier.

[0031] In one embodiment, the methods for inducing an immune response against *S. aureus* comprise delivery of the immunogenic compositions with an adjuvant. In one embodiment, the methods for inducing an immune response

against *S. aureus* provide for delivery of the immunogenic compositions with a pharmaceutically acceptable carrier.

[0032] In one embodiment, the immune response induced by the immunogenic compositions described herein, prevents or reduces a disease or condition associated with a staphylococcal organism in a subject, or prevents or reduces one or more symptoms associated with a staphylococcal organism in a subject. In one embodiment, the disease is selected from the group consisting of invasive *S. aureus* disease, sepsis and carriage.

[0033] In one embodiment, the immune response induced comprises the generation of antibodies having opsonophagocytic activity (OPA) against *S. aureus*. In one embodiment, the immune response induced comprises the generation of higher titers of opsonophagocytic antibodies specific for *S. aureus* compared to that observed in non-immunized subjects. In one embodiment, the opsonophagocytic titer is at least 1:20.

[0034] In one embodiment, the *S. aureus* against which the immune response is induced is MRSA. In one embodiment, the *S. aureus* against which the immune response is induced is MSSA. In one embodiment, the *S. aureus* against which the immune response is induced is VRSA. In one embodiment, the *S. aureus* against which the immune response is induced is VISA.

[0035] In one embodiment, the invention provides a method of preventing a staphylococcal infection in a subject undergoing a surgical procedure, the method comprising administering an immunologically effective amount of any of the immunogenic compositions as described herein to the subject prior to the surgical procedure. The surgical procedure can be an elective surgical procedure or a non-elective surgical procedure. In one embodiment, the surgical procedure is a cardio-thoracic surgical procedure. In one embodiment, the subject is a human, veterinary animal, or a livestock animal.

[0036] In one embodiment, the invention provides a method of conferring passive immunity to a subject comprising the steps of (1) generating an antibody preparation using an immunogenic compositions of the invention; and (2) administering the antibody preparation to the subject to confer passive immunity.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0037] **Figure 1** depicts the various forms of recombinant ClfA and discloses SEQ ID NOs: 125 and 127-129, respectively, in order of appearance.

[0038] **Figure 2** depicts the cloning steps used for construction of pLP1179 for expressing ClfA.

[0039] **Figure 3** depicts the T7ClfA$_{(N123)}$Y338A expression Vector, pLP1179.

[0040] **Figure 4** depicts the repeating structure of the CP5 and CP8 polysaccharides.

[0041] **Figures 5A and 5B** depict molecular weight profiles of CP5 (A) and CP8 (B) produced at different broth pHs.

[0042] **Figures 6A and 6B** depict molecular weight profiles of CP5 (A) and CP8 (B) produced at different temperatures.

[0043] **Figure 7** demonstrates the correlation of the molecular weight of purified CP5 and CP8 with the treatment time for mild acid hydrolysis.

[0044] **Figure 8A-8E** depict the alignment of ClfA between various strains of *S. aureus* (SEQ ID NOs: 62, 64, 68, 84, 70, 104, 66, 78, 86, 88, 90, 72, 74, 76, 80, 94, 82, 92, 96, 98, 100, 102, 106, and 108, respectively, in order of appearance).

[0045] **Figure 9** depicts the ClfA phylogenetic tree.

[0046] **Figure 10A-10E** depict the alignment of ClfB between various strains of *S. aureus* (SEQ ID NOs: 26, 28, 32, 18, 54, 34, 36, 30, 16, 20, 22, 24, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 56, 58, and 60, respectively, in order of appearance).

[0047] **Figure 11** depicts the ClfB phylogenetic tree.

[0048] **Figure 12** depicts the alignment of MntC between various strains of *S. aureus* (SEQ ID NOs: 2, 8, 10, 4, 6, 14 and 12, respectively, in order of appearance).

[0049] **Figure 13** demonstrates that polyclonal rabbit anti-ClfA antibodies reduce *S. aureus* 659-018 colony counts in a murine sepsis model.

[0050] **Figure 14** demonstrates that active immunization with ClfA reduces colonization of the heart by *S. aureus* PFESA0003 in the rabbit infective endocarditis model.

[0051] **Figures 15A and 15B** demonstrate that immunization with MntC reduces *S. aureus* in the blood. A: *S. aureus* PFESA0237 strain; B: *S. aureus* PFESA0266 strain.

[0052] **Figure 16** demonstrates that *S. aureus* CP5- CRM_{197} conjugate immunogenic formulation consistently exhibits protection in a murine pyelonephritis model.

[0053] **Figure 17** demonstrates that vaccination with CP8- CRM_{197} conjugate immunogenic formulation reduces death in a sepsis model.

[0054] **Figure 18** shows colony forming units (CFU) recovered in kidneys after challenge with *S. aureus* PFESA0266 in mice vaccinated with high molecular weight (HMW) CP5-CRM, low molecular weight (LMW) CP5-CRM or PP5-CRM control.

[0055] **Figure 19** shows a comparison of OPA titers (geomean) from serum obtained from mice vaccinated with different formulations of polysaccharide conjugate (high molecular weight (HMW) CP5-CRM, low molecular weight (LMW) CP5-CRM). Groups consisted of 5 to 9 mice.

[0056] **Figure 20** demonstrates OPA titer for non-human primate serum before (wk0, open symbols) and 2 weeks after (wk2, closed symbols) vaccination with different combinations of *S. aureus* antigens. The 3-antigen (3Ag) vaccine was composed of three antigens and the 4-antigent (4Ag) vaccine was composed of four antigens. Each formulation has two CP conjugates and either 1 or 2 peptides.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0057] Before the present methods and treatment methodology are described, it is to be understood that this invention is not limited to particular methods, and experimental conditions described, as such methods and conditions may vary. It is also to be understood that the terminology used herein is for purposes of describing particular embodiments only, and is not intended to be limiting.

[0058] Although any methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the invention, the preferred methods and materials are now described. All publications mentioned herein are incorporated by reference in their entirety.

[0059] The terms used herein have the meanings recognized and known to those of skill in the art, however, for convenience and completeness, particular terms and their meanings are set forth below.

[0060] As used in this specification and the appended claims, the singular forms "a", "an", and "the" include plural references unless the context clearly dictates otherwise. Thus, for example, references to "the method" includes one or more methods, and/or steps of the type described herein and/or which will become apparent to those persons skilled in the art upon reading this disclosure and so forth.

[0061] The term "about" or "approximately" means within a statistically meaningful range of a value. Such a range can be within an order of magnitude, typically within 20%, more typically still within 10%, and even more typically within 5% of a given value or range. The allowable variation encompassed by the term "about" or "approximately" depends on the particular system under study, and can be readily appreciated by one of ordinary skill in the art. Whenever a range is recited within this application, every whole number integer within the range is also contemplated as an embodiment of the invention.

[0062] An "antibody" is an immunoglobulin molecule capable of specific binding to a target, such as a carbohydrate, polynucleotide, lipid, polypeptide, etc., through at least one antigen recognition site, located in the variable region of the immunoglobulin molecule. As used herein, unless otherwise indicated by context, the term is intended to encompass not only intact polyclonal or monoclonal antibodies, but also engineered antibodies (e.g., chimeric, humanized and/or derivatized to alter effector functions, stability and other biological activities) and fragments thereof (such as Fab, Fab', F(ab')2, Fv), single chain (ScFv) and domain antibodies, including shark and camelid antibodies), and fusion proteins comprising an antibody portion, multivalent antibodies, multispecific antibodies (e.g., bispecific antibodies so long as they exhibit the desired biological activity) and antibody fragments as described herein, and any other modified configuration of the immunoglobulin molecule that comprises an antigen recognition site. An antibody includes an antibody of any class, such as IgG, IgA, or IgM (or sub-class thereof), and the antibody need not be of any particular class. Depending on the

antibody amino acid sequence of the constant domain of its heavy chains, immunoglobulins can be assigned to different classes. There are five major classes of immunoglobulins: IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM, and several of these may be further divided into subclasses (isotypes), e.g., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 and IgA2 in humans. The heavy-chain constant domains that correspond to the different classes of immunoglobulins are called alpha, delta, epsilon, gamma, and mu, respectively. The subunit structures and three-dimensional configurations of different classes of immunoglobulins are well known.

[0063] "Antibody fragments" comprise only a portion of an intact antibody, wherein the portion preferably retains at least one, preferably most or all, of the functions normally associated with that portion when present in an intact antibody.

[0064] The term "antigen" generally refers to a biological molecule, usually a protein, peptide, polysaccharide, lipid or conjugate which contains at least one epitope to which a cognate antibody can selectively bind; or in some instances to an immunogenic substance that can stimulate the production of antibodies or T-cell responses, or both, in an animal, including compositions that are injected or absorbed into an animal. The immune response may be generated to the whole molecule, or to one or more various portions of the molecule (*e.g.*, an epitope or hapten). The term may be used to refer to an individual molecule or to a homogeneous or heterogeneous population of antigenic molecules. An antigen is recognized by antibodies, T-cell receptors or other elements of specific humoral and/or cellular immunity. The term "antigen" includes all related antigenic epitopes. Epitopes of a given antigen can be identified using any number of epitope mapping techniques, well known in the art. See, *e.g.*, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, N. J. For example, linear epitopes may be determined by *e.g.*, concurrently synthesizing large numbers of peptides on solid supports, the peptides corresponding to portions of the protein molecule, and reacting the peptides with antibodies while the peptides are still attached to the supports. Such techniques are known in the art and described in, *e.g.*, U.S. Pat. No. 4,708,871; Geysen et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3998-4002; Geysen et al. (1986) *Molec. Immunol.* 23:709-715, all incorporated herein by reference in their

entireties. Similarly, conformational epitopes may be identified by determining spatial conformation of amino acids such as by, *e.g.*, x-ray crystallography and 2-dimensional nuclear magnetic resonance. See, *e.g.*, Epitope Mapping Protocols, *supra*. Furthermore, for purposes of the present invention, an "antigen" may also be used to refer to a protein that includes modifications, such as deletions, additions and substitutions (generally conservative in nature, but they may be non-conservative), to the native sequence, so long as the protein maintains the ability to elicit an immunological response. These modifications may be deliberate, as through site-directed mutagenesis, or through particular synthetic procedures, or through a genetic engineering approach, or may be accidental, such as through mutations of hosts, which produce the antigens. Furthermore, the antigen can be derived, obtained, or isolated from a microbe, *e.g.* a bacterium, or can be a whole organism. Similarly, an oligonucleotide or polynucleotide, which expresses an antigen, such as in nucleic acid immunization applications, is also included in the definition. Synthetic antigens are also included, for example, polyepitopes, flanking epitopes, and other recombinant or synthetically derived antigens (Bergmann et al. (1993) *Eur. J. Immunol.* 23:2777 2781; Bergmann et al. (1996) *J. Immunol.* 157:3242 3249; Suhrbier, A. (1997) *Immunol. and Cell Biol.* 75:402 408; Gardner et al. (1998) 12th World AIDS Conference, Geneva, Switzerland, Jun. 28 - Jul. 3, 1998).

[0065] The term "adjuvant" refers to a compound or mixture that enhances the immune response to an antigen as further described and exemplified herein.

[0066] "Bacteremia" is a transient presence of bacteria in the blood. A bacteremia can progress to septicemia, or sepsis, which would be considered an infection and is the persistent presence of bacteria in the blood with associated clinical signs/symptoms. Not all bacteria are capable of surviving in the blood. Those that do have special genetic traits that provide for that ability. Also, the host factors play an important role as well.

[0067] "Capsular polysaccharide" or "capsule polysaccharide" refers to the polysaccharide capsule that is external to the cell wall of most isolates of Staphylococci. For example, *S. aureus* includes a cell wall component composed of a peptidoglycan complex, which enables the organism to survive under

unfavorable osmotic conditions and also includes a unique teichoic acid linked to the peptidoglycan. External to the cell wall a thin polysaccharide capsule coats most isolates of *S. aureus*. This serologically distinct capsule can be used to serotype various isolates of *S. aureus*. Many of the clinically significant isolates have been shown to include two capsular types: serotype 5 (CP5) and serotype 8 (CP8). The structures of CP5 and CP8 are shown schematically in Figure 4.

[0068] As used herein, "conjugates" comprise a capsule polysaccharide usually of a desired range of molecular weight and a carrier protein, wherein the capsule polysaccharide is conjugated to the carrier protein. Conjugates may or may not contain some amount of free capsule polysaccharide. As used herein, "free capsule polysaccharide" refers to capsule polysaccharide that is non-covalently associated with (i.e., non-covalently bound to, adsorbed to or entrapped in or with) the conjugated capsular polysaccharide-carrier protein. The terms "free capsule polysaccharide," "free polysaccharide" and "free saccharide" may be used interchangeably and are intended to convey the same meaning. Regardless of the nature of the carrier molecule, it can be conjugated to the capsular polysaccharide either directly or through a linker. As used herein, "to conjugate", "conjugated" and "conjugating" refers to a process whereby a bacterial capsular polysaccharide is covalently attached to the carrier molecule. Conjugation enhances the immunogenicity of the bacterial capsular polysaccharide. The conjugation can be performed according to the methods described below or by processes known in the art.

[0069] As described above, the present invention relates to conjugates comprising *S. aureus* serotype 5 capsular polysaccharides (CP5) conjugated to carrier proteins and conjugates comprising *S. aureus* serotype 8 capsular polysaccharides (CP8) conjugated to carrier proteins. One embodiment of the invention provides conjugates comprising a *S. aureus* serotype 5 capsular polysaccharide conjugated to a carrier protein and a *S. aureus* serotype 8 capsular polysaccharide conjugated to a carrier protein wherein: the type 5 capsular polysaccharide has a molecular weight of between 50 kDa and 800 kDa; the type 8 capsular polysaccharide has a molecular weight of between 50 and 700 kDa; the immunogenic conjugates have molecular weights of between about 1000 kDa and

about 5000 kDa; and the conjugates comprise less than about 30% free polysaccharide relative to total polysaccharide. In one embodiment, the conjugates comprise less than about 25%, about 20%, about 15%, about 10%, or about 5% free polysaccharide relative to total polysaccharide. In one embodiment, the type 5 or 8 polysaccharide has a molecular weight between 20 kDa and 1000 kDa.

[0070] In one embodiment, the conjugate has a molecular weight of between about 50 kDa and about 5000 kDa. In one embodiment, the conjugate has a molecular weight of between about 200 kDa and about 5000 kDa. In one embodiment, the immunogenic conjugate has a molecular weight of between about 400 kDa and about 2500 kDa. In one embodiment, the immunogenic conjugate has a molecular weight of between about 500 kDa and about 2500 kDa. In one embodiment, the immunogenic conjugate has a molecular weight of between about 600 kDa and about 2800 kDa. In one embodiment, the immunogenic conjugate has a molecular weight of between about 700 kDa and about 2700 kDa. In one embodiment, the immunogenic conjugate has a molecular weight of between about 1000 kDa and about 2000 kDa; between about 1800 kDa and about 2500 kDa; between about 1100 kDa and about 2200 kDa; between about 1900 kDa and about 2700 kDa; between about 1200 kDa and about 2400 kDa; between about 1700 kDa and about 2600 kDa; between about 1300 kDa and about 2600 kDa; between about 1600 kDa and about 3000 kDa.

[0071] Accordingly, in one embodiment, the carrier protein within the immunogenic conjugate of the invention is CRM_{197}, and the CRM_{197} is covalently linked to the capsular polysaccharide via a carbamate linkage, an amide linkage, or both. The number of lysine residues in the carrier protein that become conjugated to a capsular polysaccharide can be characterized as a range of conjugated lysines. For example, in a given immunogenic composition, the CRM_{197} may comprise 5 to 15 lysines out of 39 covalently linked to the capsular polysaccharide. Another way to express this parameter is that 12% to 40% of CRM_{197} lysines are covalently linked to the capsular polysaccharide. In some embodiments, the CRM_{197} portion of the polysaccharide covalently bound to the CRM_{197} comprises 5 to 22 lysines covalently linked to the polysaccharide. In some embodiments, the CRM_{197} portion of the polysaccharide covalently bound to the CRM_{197} comprises 5 to 23

lysines covalently linked to the polysaccharide. In some embodiments, the CRM_{197} portion of the polysaccharide covalently bound to carrier protein of comprises 8 to 15 lysines covalently linked to the polysaccharide. In some embodiments, the CRM_{197} portion of the polysaccharide covalently bound to carrier protein of comprises 8 to 12 lysines covalently linked to the polysaccharide. For example, in a given immunogenic composition, the CRM_{197} may comprise 18 to 22 lysines out of 39 covalently linked to the capsular polysaccharide. Another way to express this parameter is that 40% to 60% of CRM_{197} lysines are covalently linked to the capsular polysaccharide. In some embodiments, the CRM_{197} comprises 5 to 15 lysines out of 39 covalently linked to CP8. Another way to express this parameter is that 12% to 40% of CRM_{197} lysines are covalently linked to CP8. In some embodiments, the CRM_{197} comprises 18 to 22 lysines out of 39 covalently linked to CP5. Another way to express this parameter is that 40% to 60% of CRM_{197} lysines are covalently linked to CP5.

[0072] As discussed above, the number of lysine residues in the carrier protein conjugated to the capsular polysaccharide can be characterized as a range of conjugated lysines, which may be expressed as a molar ratio. For example, the molar ratio of conjugated lysines to CRM_{197} in the CP8 immunogenic conjugate can be between about 18:1 to about 22:1. In one embodiment, the range of molar ratio of conjugated lysines to CRM_{197} in the CP8 immunogenic conjugate can be between about 15:1 to about 25:1. In some embodiments, the range of molar ratio of conjugated lysines to CRM_{197} in the CP8 immunogenic conjugate can be between about 14:1 to about 20:1; about 12:1 to about 18:1; about 10:1 to about 16:1; about 8:1 to about 14:1; about 6:1 to about 12:1; about 4:1 to about 10:1; about 20:1 to about 26:1; about 22:1 to about 28:1; about 24:1 to about 30:1; about 26:1 to about 32:1; about 28:1 to about 34:1; about 30:1 to about 36:1; about 5:1 to about 10:1; about 5:1 to about 20:1; about 10:1 to about 20:1; or about 10:1 to about 30:1. Also, the molar ratio of conjugated lysines to CRM197 in the CP5 immunogenic conjugate can be between about 3:1 and 25:1. In one embodiment, the range of molar ratio of conjugated lysines to CRM197 in the CP5 immunogenic conjugate can be between about 5:1 to about 20:1. In one embodiment, the range of molar ratio of conjugated lysines to CRM197 in the CP5 immunogenic

conjugate can be between about 4:1 to about 20:1; about 6:1 to about 20:1; about 7:1 to about 20:1; about 8:1 to about 20:1; about 10:1 to about 20:1; about 11:1 to about 20:1; about 12:1 to about 20:1; about 13:1 to about 20:1; about 14:1 to about 20:1; about 15:1 to about 20:1; about 16:1 to about 20:1; about 17:1 to about 20:1; about 18:1 to about 20:1; about 5:1 to about 18:1; about 7:1 to about 16:1; or about 9:1 to about 14:1.

[0073] Another way to express the number of lysine residues in the carrier protein conjugated to the capsular polysaccharide can be as a range of conjugated lysines. For example, in a given CP8 immunogenic conjugate, the CRM_{197} may comprise 5 to 15 lysines out of 39 covalently linked to the capsular polysaccharide. Alternatively, this parameter can be expressed as a percentage. For example, in a given CP8 immunogenic conjugate, the percentage of conjugated lysines can be between 10% to 50%. In some embodiments, 20% to 50% of lysines can be covalently linked to CP8. Alternatively still, 30% to 50% of CRM_{197} lysines can be covalently linked to the CP8; 10% to 40% of CRM_{197} lysines; 10% to 30% of CRM_{197} lysines; 20% to 40% of CRM_{197} lysines; 25% to 40% of CRM_{197} lysines; 30% to 40% of CRM_{197} lysines; 10% to 30% of CRM_{197} lysines; 15% to 30% of CRM_{197} lysines; 20% to 30% of CRM_{197} lysines; 25% to 30% of CRM_{197} lysines; 10% to 15% of CRM_{197} lysines; or 10% to 12% of CRM_{197} lysines are covalently linked to CP8. Also, in a given CP5 immunogenic conjugate, the CRM_{197} may comprise 18 to 22 lysines out of 39 covalently linked to the capsular polysaccharide. Alternatively, this parameter can be expressed as a percentage. For example, in a given CP5 immunogenic conjugate, the percentage of conjugated lysines can be between 40% to 60%. In some embodiments, 40% to 60% of lysines can be covalently linked to CP5. Alternatively still, 30% to 50% of CRM_{197} lysines can be covalently linked to CP5; 20% to 40% of CRM_{197} lysines; 10% to 30% of CRM_{197} lysines; 50% to 70% of CRM_{197} lysines; 35% to 65% of CRM_{197} lysines; 30% to 60% of CRM_{197} lysines; 25% to 55% of CRM_{197} lysines; 20% to 50% of CRM_{197} lysines; 15% to 45% of CRM_{197} lysines; 10% to 40% of CRM_{197} lysines; 40% to 70% of CRM_{197} lysines; or 45% to 75% of CRM_{197} lysines are covalently linked to CP5.

[0074] The frequency of attachment of the capsular polysaccharide chain to a lysine on the carrier molecule is another parameter for characterizing conjugates of capsule polysaccharides. For example, in one embodiment, at least one covalent linkage between CRM_{197} and polysaccharide occurs for at least every 5 to 10 saccharide repeat units of the capsular polysaccharide. In another embodiment, there is at least one covalent linkage between CRM_{197} and capsular polysaccharide for every 5 to 10 saccharide repeat units; every 2 to 7 saccharide repeat units, every 3 to 8 saccharide repeat units; every 4 to 9 saccharide repeat units; every 6 to 11 saccharide repeat units; every 7 to 12 saccharide repeat units; every 8 to 13 saccharide repeat units; every 9 to 14 saccharide repeat units; every 10 to 15 saccharide repeat units; every 2 to 6 saccharide repeat units, every 3 to 7 saccharide repeat units; every 4 to 8 saccharide repeat units; every 6 to 10 saccharide repeat units; every 7 to 11 saccharide repeat units; every 8 to 12 saccharide repeat units; every 9 to 13 saccharide repeat units; every 10 to 14 saccharide repeat units; every 10 to 20 saccharide repeat units; every 5 to 10 saccharide repeat units of the capsular polysaccharide. In another embodiment, at least one linkage between CRM_{197} and capsular polysaccharide occurs for every 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, or 20 saccharide repeat units of the capsular polysaccharide.

[0075] The chemical activation of the polysaccharides and subsequent conjugation to the carrier protein may be achieved by conventional means. See, for example, U.S. Pat. Nos. 4,673,574 and 4,902,506. Other activation and conjugation methods may alternatively be used.

[0076] "Carrier protein" or "protein carrier" as used herein, refers to any protein molecule that may be conjugated to an antigen (such as the capsular polysaccharides) against which an immune response is desired. Conjugation of an antigen such as a polysaccharide to a carrier protein can render the antigen immunogenic. Carrier proteins are preferably proteins that are non-toxic and non-reactogenic and obtainable in sufficient amount and purity. Examples of carrier proteins are toxins, toxoids or any mutant cross-reactive material (CRM_{197}) of the toxin from tetanus, diphtheria, pertussis, *Pseudomonas* species, *E. coli*, *Staphylococcus* species, and *Streptococcus* species. Carrier proteins should be

amenable to standard conjugation procedures. In a particular embodiment of the present invention, CRM_{197} is used as the carrier protein.

[0077] CRM_{197} (Wyeth/Pfizer, Sanford, NC) is a non-toxic variant (i.e., toxoid) of diphtheria toxin isolated from cultures of *Corynebacterium diphtheria* strain C7 (β_{197}) grown in casamino acids and yeast extract-based medium. CRM_{197} is purified through ultra-filtration, ammonium sulfate precipitation, and ion-exchange chromatography. A culture of *Corynebacterium diphtheriae* strain C7 ($_{197}$), which produces CRM_{197} protein, has been deposited with the American Type Culture Collection, Rockville, Maryland and has been assigned accession number ATCC 53281. Other diphtheria toxoids are also suitable for use as carrier proteins.

[0078] Other suitable carrier proteins include inactivated bacterial toxins such as tetanus toxoid, pertussis toxoid, cholera toxoid (*e.g.*, as described in International Patent Application WO2004/083251), *E. coli* LT, *E. coli* ST, and exotoxin A from *Pseudomonas aeruginosa*. Bacterial outer membrane proteins such as outer membrane protein complex c (OMPC), porins, transferrin binding proteins, pneumolysin, pneumococcal surface protein A (PspA), pneumococcal adhesin protein (PsaA), C. *difficile* enterotoxin (toxin A) and cytotoxin (toxin B) or *Haemophilus influenzae* protein D, can also be used. Other proteins, such as ovalbumin, keyhole limpet hemocyanin (KLH), bovine serum albumin (BSA) or purified protein derivative of tuberculin (PPD) can also be used as carrier proteins.

[0079] After conjugation of the capsular polysaccharide to the carrier protein, the polysaccharide-protein conjugates are purified (enriched with respect to the amount of polysaccharide-protein conjugate) by a variety of techniques. These techniques include, e.g., concentration/diafiltration operations, precipitation/elution, column chromatography, and depth filtration. See examples below.

[0080] After the individual conjugates are purified, they may be combined to formulate an immunogenic composition of the present invention, which may be used, for example, in a vaccine. Formulation of the immunogenic composition of the present invention can be accomplished using art-recognized methods.

[0081] It is noted that in this disclosure, terms such as "comprises", "comprised", "comprising", "contains", "containing" and the like can have the meaning

attributed to them in U.S. patent law; *e.g.*, they can mean "includes", "included", "including" and the like. Such terms refer to the inclusion of a particular ingredients or set of ingredients without excluding any other ingredients. Terms such as "consisting essentially of" and "consists essentially of" have the meaning attributed to them in U.S. patent law, *e.g.*, they allow for the inclusion of additional ingredients or steps that do not detract from the novel or basic characteristics of the invention, *i.e.*, they exclude additional unrecited ingredients or steps that detract from novel or basic characteristics of the invention, and they exclude ingredients or steps of the prior art, such as documents in the art that are cited herein or are incorporated by reference herein, especially as it is a goal of this document to define embodiments that are patentable, *e.g.*, novel, non-obvious, inventive, over the prior art, *e.g.*, over documents cited herein or incorporated by reference herein. And, the terms "consists of" and "consisting of" have the meaning ascribed to them in U.S. patent law; namely, that these terms are close-ended. Accordingly, these terms refer to the inclusion of a particular ingredient or set of ingredients and the exclusion of all other ingredients.

[0082] A "conservative amino acid substitution" refers to the substitution of one or more of the amino acid residues of a protein with other amino acid residues having similar physical and/or chemical properties. Substitutes for an amino acid within the sequence may be selected from other members of the class to which the amino acid belongs. For example, the nonpolar (hydrophobic) amino acids include alanine, leucine, isoleucine, valine, proline, phenylalanine, tryptophan and methionine. Amino acids containing aromatic ring structures are phenylalanine, tryptophan, and tyrosine. The polar neutral amino acids include glycine, serine, threonine, cysteine, tyrosine, asparagine, and glutamine. The positively charged (basic) amino acids include arginine, lysine and histidine. The negatively charged (acidic) amino acids include aspartic acid and glutamic acid. Such alterations will not be expected to affect apparent molecular weight as determined by polyacrylamide gel electrophoresis, or isoelectric point. Particularly preferred substitutions are: Lys for Arg and vice versa such that a positive charge may be maintained; Glu for Asp and vice versa such that a negative charge may be

maintained; Ser for Thr such that a free --OH can be maintained; and Gln for Asn such that a free NH_2 can be maintained.

[0083] "Fragment" refers to proteins where only specific domains of a larger protein are included. For example, ClfA and ClfB proteins contain as many as 8 domains each if the signal sequences are included. A polypeptide corresponding to the N1N2N3, N2N3, N1N2, N1, N2, or N3 domains are each considered to be fragments of ClfA or ClfB. "Fragment" also refers to either a protein or polypeptide comprising an amino acid sequence of at least 4 amino acid residues (preferably, at least 10 amino acid residues, at least 15 amino acid residues, at least 20 amino acid residues, at least 25 amino acid residues, at least 40 amino acid residues, at least 50 amino acid residues, at least 60 amino residues, at least 70 amino acid residues, at least 80 amino acid residues, at least 90 amino acid residues, at least 100 amino acid residues, at least 125 amino acid residues, or at least 150 amino acid residues) of the amino acid sequence of a parent protein or polypeptide or a nucleic acid comprising a nucleotide sequence of at least 10 base pairs (preferably at least 20 base pairs, at least 30 base pairs, at least 40 base pairs, at least 50 base pairs, at least 50 base pairs, at least 100 base pairs, at least 200 base pairs) of the nucleotide sequence of the parent nucleic acid.

[0084] "Functional activity" of an antibody or "functional antibody" as used herein refers to an antibody that, at a minimum, can bind specifically to an antigen. Additional functions are known in the art and may include additional components of the immune system that effect clearance or killing of the pathogen such as through opsonization, ADCC or complement-mediated cytotoxicity. After antigen binding, any subsequent antibody functions can be mediated through the Fc region of the antibody. The antibody opsonophagocytic assay (OPA) is an *in vitro* assay designed to measure *in vitro* Ig complement-assisted killing of bacteria with effector cells (white blood cells), thus mimicking a biological process. Antibody binding may also directly inhibit the biological function of the antigen it binds, e.g., antibodies that bind ClfA can neutralize its enzymatic function. In some embodiments, a "functional antibody" refers to an antibody that is functional as measured by the killing of bacteria in an animal efficacy model or an

opsonophagocytic killing assay that demonstrates that the antibodies kill the bacteria.

[0085] The molecular weight of the *S. aureus* capsule polysaccharides is a consideration for use in immunogenic compositions. For example, high molecular weight capsule polysaccharides may be able to induce certain antibody immune responses due to a higher valency of the epitopes present on the antigenic surface. The isolation of "high molecular weight capsular polysaccharides" is contemplated for use in the compositions and methods of the present invention. For example, in one embodiment of the invention, the isolation of type 5 high molecular weight polysaccharides ranging in size from about 50 to about 800 kDa in molecular weight is contemplated. In one embodiment of the invention, the isolation of type 5 high molecular weight polysaccharides ranging in size from about 20 to about 1000 kDa in molecular weight is contemplated. In one embodiment of the invention, the isolation and purification of type 5 high molecular weight capsular polysaccharides ranging in size from about 50 to about 300 kDa in molecular weight is contemplated. In one embodiment, the isolation and purification of type 5 high molecular weight capsular polysaccharide ranging from 70 kDa to 300 kDa in molecular weight is contemplated. In one embodiment, the isolation and purification of type 5 high molecular weight capsular polysaccharide ranging from 90 kDa to 250 kDa in molecular weight is contemplated. In one embodiment, the isolation and purification of type 5 high molecular weight capsular polysaccharide ranging from 90 kDa to 150 kDa in molecular weight is contemplated. In one embodiment, the isolation and purification of type 5 high molecular weight capsular polysaccharide ranging from 90 kDa to 140 kDa in molecular weight is contemplated. In one embodiment, the isolation and purification of type 5 high molecular weight capsular polysaccharide ranging from 80 kDa to 120 kDa in molecular weight is contemplated. Other ranges of high molecular weight serotype 5 capsular polysaccharide that can be isolated and purified by the methods of this invention include size ranges of about 70 kDa to about 100 kDa in molecular weight; 70 kDa to 110 kDa in molecular weight; 70 kDa to 120 kDa in molecular weight; 70 kDa to 130 kDa in molecular weight; 70 kDa to 140 kDa in molecular weight; 70 kDa to 150 kDa in molecular weight; 70 kDa to 160 kDa in molecular

weight; 80 kDa to 110 kDa in molecular weight; 80 kDa to 120 kDa in molecular weight; 80 kDa to 130 kDa in molecular weight; 80 kDa to 140 kDa in molecular weight; 80 kDa to 150 kDa in molecular weight; 80 kDa to 160 kDa in molecular weight; 90 kDa to 110 kDa in molecular weight; 90 kDa to 120 kDa in molecular weight; 90 kDa to 130 kDa in molecular weight; 90 kDa to 140 kDa in molecular weight; 90 kDa to 150 kDa in molecular weight; 90 kDa to 160 kDa in molecular weight; 100 kDa to 120 kDa in molecular weight; 100 kDa to 130 kDa in molecular weight; 100 kDa to 140 kDa in molecular weight; 100 kDa to 150 kDa in molecular weight; 100 kDa to 160 kDa in molecular weight; and similar desired molecular weight ranges.

[0086] As discussed above, the molecular weight of the *S. aureus* capsule polysaccharides is a consideration for use in immunogenic compositions. For example, high molecular weight capsule polysaccharides may be able to induce certain antibody immune responses due to a higher valency of the epitopes present on the antigenic surface. In one embodiment of the invention, the isolation and purification of type 8 high molecular weight capsular polysaccharides ranging from about 20 kDa to about 1000 kDa in molecular weight is contemplated. In one embodiment of the invention, the isolation and purification of type 8 high molecular weight capsular polysaccharides ranging from about 50 kDa to about 700 kDa in molecular weight is contemplated. In one embodiment of the invention, the isolation and purification of type 8 high molecular weight capsular polysaccharides ranging from 50 kDa to 300 kDa in molecular weight is contemplated. In one embodiment, the isolation and purification of type 8 high molecular weight capsular polysaccharide ranging from 70 kDa to 300 kDa in molecular weight is contemplated. In one embodiment, the isolation and purification of type 8 high molecular weight capsular polysaccharides ranging from 90 kDa to 250 kDa in molecular weight is contemplated. In one embodiment, the isolation and purification of type 8 high molecular weight capsular polysaccharides ranging from 90 kDa to 150 kDa in molecular weight is contemplated. In one embodiment, the isolation and purification of type 8 high molecular weight capsular polysaccharides ranging from 90 kDa to 120 kDa in molecular weight is contemplated. In one embodiment, the isolation and

purification of type 8 high molecular weight capsular polysaccharides ranging from 80 kDa to 120 kDa in molecular weight is contemplated. Other ranges of high molecular weight serotype 8 capsular polysaccharides that can be isolated and purified by the methods of this invention include size ranges of about 70 kDa to about 100 kDa in molecular weight; 70 kDa to 110 kDa in molecular weight; 70 kDa to 120 kDa in molecular weight; 70 kDa to 130 kDa in molecular weight; 70 kDa to 140 kDa in molecular weight; 70 kDa to 150 kDa in molecular weight; 70 kDa to 160 kDa in molecular weight; 80 kDa to 110 kDa in molecular weight; 80 kDa to 120 kDa in molecular weight; 80 kDa to 130 kDa in molecular weight; 80 kDa to 140 kDa in molecular weight; 80 kDa to 150 kDa in molecular weight; 80 kDa to 160 kDa in molecular weight; 90 kDa to 110 kDa in molecular weight; 90 kDa to 120 kDa in molecular weight; 90 kDa to 130 kDa in molecular weight; 90 kDa to 140 kDa in molecular weight; 90 kDa to 150 kDa in molecular weight; 90 kDa to 160 kDa in molecular weight; 100 kDa to 120 kDa in molecular weight; 100 kDa to 130 kDa in molecular weight; 100 kDa to 140 kDa in molecular weight; 100 kDa to 150 kDa in molecular weight; 100 kDa to 160 kDa in molecular weight; and similar desired molecular weight ranges.

[0087] An "immune response" to an immunogenic composition is the development in a subject of a humoral and/or a cell-mediated immune response to molecules present in the composition of interest (for example, an antigen, such as a protein or polysaccharide). For purposes of the present invention, a "humoral immune response" is an antibody-mediated immune response and involves the generation of antibodies with affinity for the antigens present in the immunogenic compositions of the invention, while a "cell-mediated immune response" is one mediated by T-lymphocytes and/or other white blood cells. A "cell-mediated immune response" is elicited by the presentation of antigenic epitopes in association with Class I or Class II molecules of the major histocompatibility complex (MHC). This activates antigen-specific CD4+ T helper cells or CD8+ cytotoxic T lymphocyte cells ("CTLs"). CTLs have specificity for peptide or lipid antigens that are presented in association with proteins encoded by the major histocompatibility complex (MHC) or CD1 and expressed on the surfaces of cells. CTLs help induce and promote the intracellular destruction of intracellular

microbes, or the lysis of cells infected with such microbes. Another aspect of cellular immunity involves an antigen-specific response by helper T-cells. Helper T-cells act to help stimulate the function, and focus the activity of, nonspecific effector cells against cells displaying peptide antigens in association with classical or nonclassical MHC molecules on their surface. A "cell-mediated immune response" also refers to the production of cytokines, chemokines and other such molecules produced by activated T-cells and/or other white blood cells, including those derived from CD4+ and CD8+ T-cells. The ability of a particular antigen or composition to stimulate a cell-mediated immunological response may be determined by a number of assays, such as by lymphoproliferation (lymphocyte activation) assays, CTL cytotoxic cell assays, by assaying for T-lymphocytes specific for the antigen in a sensitized subject, or by measurement of cytokine production by T cells in response to restimulation with antigen. Such assays are well known in the art. See, *e.g.*, Erickson et al., *J. Immunol.* (1993) 151:4189-4199; Doe et al., *Eur. J. Immunol.* (1994) 24:2369-2376.

[0088] The term "immunogenic" refers to the ability of an antigen or a vaccine to elicit an immune response, either humoral or cell-mediated, or both.

[0089] An "immunogenic amount", or an "immunologically effective amount" or "dose", each of which is used interchangeably herein, generally refers to the amount of antigen or immunogenic composition sufficient to elicit an immune response, either a cellular (T cell) or humoral (B cell or antibody) response, or both, as measured by standard assays known to one skilled in the art.

[0090] The amount of a particular conjugate in a composition is generally calculated based on total polysaccharide, conjugated and non-conjugated for that conjugate. For example, a CP5 conjugate with 20% free polysaccharide will have about 80 mcg of conjugated CP5 polysaccharide and about 20 mcg of non-conjugated CP5 polysaccharide in a 100 mcg CP5 polysaccharide dose. The protein contribution to the conjugate is usually not considered when calculating the dose of a conjugate. The amount of conjugate can vary depending upon the staphylococcal serotype. Generally, each dose will comprise 0.01 to 100 mcg of polysaccharide, particularly 0.1 to 10 mcg, and more particularly 1 to 10 mcg. The "immunogenic amount" of the different polysaccharide components in the

immunogenic composition, may diverge and each may comprise 0.01 mcg, 0.1 mcg, 0.25 mcg, 0.5 mcg, 1 mcg, 2 mcg, 3 mcg, 4 mcg, 5 mcg, 6 mcg, 7 mcg, 8 mcg, 9 mcg, 10 mcg, 15 mcg, 20 mcg, 30 mcg, 40 mcg,50 mcg, 60 mcg, 70 mcg, 80 mcg, 90 mcg, or about 100 mcg of any particular polysaccharide antigen.

[0091] In another embodiment, the "immunogenic amount" of the protein components in the immunogenic composition, may range from about 10 mcg to about 300 mcg of each protein antigen. In a particular embodiment, the "immunogenic amount" of the protein components in the immunogenic composition, may range from about 20 mcg to about 200 mcg of each protein antigen. The "immunogenic amount" of the different protein components in the immunogenic composition may diverge, and each comprise 10 mcg, 20 mcg, 30 mcg, 40 mcg, 50 mcg, 60 mcg, 70 mcg, 80 mcg, 90 mcg, 100 mcg, 125 mcg, 150 mcg, 175 mcg or about 200 mcg of any particular protein antigen.

[0092] The effectiveness of an antigen as an immunogen can be measured by measuring the levels of B cell activity by measuring the levels of circulating antibodies specific for the antigen in serum using immunoassays, immunoprecipitation assays, functional antibody assays, such as *in vitro* opsonic assay and many other assays known in the art. Another measure of effectiveness of an antigen as an T-cell immunogen can be measured by either by proliferation assays, by cytolytic assays, such as chromium release assays to measure the ability of a T cell to lyse its specific target cell. Furthermore, in the present invention, an "immunogenic amount" may also be defined by measuring the serum levels of antigen specific antibody induced following administration of the antigen, or, by measuring the ability of the antibodies so induced to enhance the opsonophagocytic ability of particular white blood cells, as described herein. The level of protection of the immune response may be measured by challenging the immunized host with the antigen that has been injected. For example, if the antigen to which an immune response is desired is a bacterium, the level of protection induced by the "immunogenic amount" of the antigen can be measured by detecting the percent survival or the percent mortality after challenge of the animals with the bacterial cells. In one embodiment, the amount of protection may be measured by measuring at least one symptom associated with the bacterial

infection, for example, a fever associated with the infection. The amount of each of the antigens in the multi-antigen or multi-component vaccine or immunogenic compositions will vary with respect to each of the other components and can be determined by methods known to the skilled artisan. Such methods would include, for example, procedures for measuring immunogenicity and/or *in vivo* efficacy.

[0093] The term "immunogenic composition" relates to any pharmaceutical composition containing an antigen, *e.g.* a microorganism, or a component thereof, which composition can be used to elicit an immune response in a subject. The immunogenic compositions of the present invention can be used to treat a human susceptible to *S. aureus* infection, by means of administering the immunogenic compositions via a systemic transdermal or mucosal route. These administrations can include injection via the intramuscular (i.m.), intraperitoneal (i.p.), intradermal (i.d.) or subcutaneous routes; application by a patch or other transdermal delivery device; or via mucosal administration to the oral/alimentary, respiratory or genitourinary tracts. In one embodiment, intranasal administration is used for the treatment or prevention of nasopharyngeal carriage of *S. aureus*, thus attenuating infection at its earliest stage. In one embodiment, the immunogenic composition may be used in the manufacture of a vaccine or in the elicitation of a polyclonal or monoclonal antibodies that could be used to passively protect or treat an animal.

[0094] Optimal amounts of components for a particular immunogenic composition can be ascertained by standard studies involving observation of appropriate immune responses in subjects. Following an initial vaccination, subjects can receive one or several booster immunizations adequately spaced.

[0095] In one embodiment of the present invention, the *S. aureus* immunogenic composition comprises a recombinant *S. aureus* clumping factor A (ClfA) fragment (N1N2N3, or combinations thereof), an isolated capsular polysaccharides type 5 conjugated to CRM_{197} and an isolated capsular polysaccharides type 8 conjugated to CRM_{197}. In another embodiment, the *S. aureus* immunogenic composition is a sterile formulation (liquid, lyophilized, DNA vaccine, intradermal preparation) of recombinant *S. aureus* clumping factor (ClfA) fragment (N1N2N3, or combinations thereof), recombinant *S. aureus* clumping factor B (ClfB) fragment (N1N2N3, or combinations thereof), an isolated capsular polysaccharides

type 5 conjugated to CRM_{197} and an isolated capsular polysaccharides type 8 conjugated to CRM_{197}. In one embodiment of the present invention, the *S. aureus* immunogenic composition comprises a recombinant *S. aureus* clumping factor A (ClfA) fragment (N1N2N3, or combinations thereof), *S. aureus* iron binding protein MntC, an isolated capsular polysaccharides type 5 conjugated to CRM_{197} and an isolated capsular polysaccharides type 8 conjugated to CRM_{197}. In one embodiment, the *S. aureus* immunogenic composition is a sterile formulation (liquid, lyophilized, DNA vaccine, intradermal preparation) of recombinant *S. aureus* clumping factor (ClfA) fragment (N1N2N3, or combinations thereof), recombinant *S. aureus* clumping factor B (ClfB) fragment (N1N2N3, or combinations thereof), *S. aureus* iron binding protein MntC, an isolated capsular polysaccharides type 5 conjugated to CRM_{197} and an isolated capsular polysaccharides type 8 conjugated to CRM_{197}. In one embodiment of the present invention, the *S. aureus* immunogenic composition comprises a recombinant *S. aureus* clumping factor B (ClfB) fragment (N1N2N3, or combinations thereof), an isolated capsular polysaccharides type 5 conjugated to CRM_{197} and an isolated capsular polysaccharides type 8 conjugated to CRM_{197}. In one embodiment of the present invention, the *S. aureus* immunogenic composition comprises a recombinant *S. aureus* clumping factor B (ClfB) fragment (N1N2N3, or combinations thereof), *S. aureus* iron binding protein MntC, an isolated capsular polysaccharides type 5 conjugated to CRM_{197} and an isolated capsular polysaccharides type 8 conjugated to CRM_{197}. In one embodiment of the present invention, the *S. aureus* immunogenic composition comprises a *S. aureus* iron binding protein MntC, an isolated capsular polysaccharides type 5 conjugated to CRM_{197} and an isolated capsular polysaccharides type 8 conjugated to CRM_{197}.

[0096] The immunogenic compositions of the present invention can further comprise one or more additional "immunomodulators", which are agents that perturb or alter the immune system, such that either up-regulation or down-regulation of humoral and/or cell-mediated immunity is observed. In one particular embodiment, up-regulation of the humoral and/or cell-mediated arms of the immune system is preferred. Examples of certain immunomodulators include, for example, an adjuvant or cytokine, or ISCOMATRIX (CSL Limited, Parkville,

Australia), described in U.S. Patent No. 5,254,339 among others. Non-limiting examples of adjuvants that can be used in the vaccine of the present invention include the RIBI adjuvant system (Ribi Inc., Hamilton, Mont.), alum, mineral gels such as aluminum hydroxide gel, oil-in-water emulsions, water-in-oil emulsions such as, *e.g.*, Freund's complete and incomplete adjuvants, Block copolymer (CytRx, Atlanta Ga.), QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge Mass.), SAF-M (Chiron, Emeryville Calif.), AMPHIGEN® adjuvant, saponin, Quil A or other saponin fraction, monophosphoryl lipid A, and Avridine lipid-amine adjuvant. Non-limiting examples of oil-in-water emulsions useful in the vaccine of the invention include modified SEAM62 and SEAM 1/2 formulations. Modified SEAM62 is an oil-in-water emulsion containing 5% (v/v) squalene (Sigma), 1% (v/v) SPAN® 85 detergent (ICI Surfactants), 0.7% (v/v) polysorbate ® 80 detergent (ICI Surfactants), 2.5% (v/v) ethanol, 200 µg/ml Quil A, 100 µg/ml cholesterol, and 0.5% (v/v) lecithin. Modified SEAM 1/2 is an oil-in-water emulsion comprising 5% (v/v) squalene, 1% (v/v) SPAN® 85 detergent, 0.7% (v/v) polysorbate 80 detergent, 2.5% (v/v) ethanol, 100 µg/ml Quil A, and 50 µg/ml cholesterol. Other "immunomodulators" that can be included in the vaccine include, *e.g.*, one or more interleukins, interferons, or other known cytokines or chemokines. In one embodiment, the adjuvant may be a cyclodextrin derivative or a polyanionic polymer, such as those described in U.S. patent numbers 6,165,995 and 6,610,310, respectively. It is to be understood that the immunomodulator and/or adjuvant to be used will depend on the subject to which the vaccine or immunogenic composition will be administered, the route of injection and the number of injections to be given.

[0097] *S. aureus* "invasive disease" is the isolation of bacteria from a normally sterile site, where there is associated clinical signs/symptoms of disease. Normally sterile body sites include blood, CSF, pleural fluid, pericardial fluid, peritoneal fluid, joint/synovial fluid, bone, internal body site (lymph node, brain, heart, liver, spleen, vitreous fluid, kidney, pancreas, ovary), or other normally sterile sites. Clinical conditions characterizing invasive diseases include bacteremia, pneumonia, cellulitis, osteomyelitis, endocarditis, septic shock and more.

[0098] The term "isolated" means that the material is removed from its original environment (*e.g.*, the natural environment if it is naturally occurring or from it's host organism if it is a recombinant entity, or taken from one environment to a different environment). For example, an "isolated" capsule polysaccharide, protein or peptide is substantially free of cellular material or other contaminating proteins from the cell or tissue source from which the protein is derived, or substantially free of chemical precursors or other chemicals when chemically synthesized, or otherwise present in a mixture as part of a chemical reaction. In the present invention, the proteins or polysaccharides may be isolated from the bacterial cell or from cellular debris, so that they are provided in a form useful in the manufacture of an immunogenic composition. The term "isolated" or "isolating" may include purifying, or purification, including for example, the methods of purification of the proteins or capsular polysaccharides, as described herein. The language "substantially free of cellular material" includes preparations of a polypeptide/protein in which the polypeptide/protein is separated from cellular components of the cells from which it is isolated or recombinantly produced. Thus, a capsule polysaccharide, protein or peptide that is substantially free of cellular material includes preparations of the capsule polysaccharide, protein or peptide having less than about 30%, 20%, 10%, 5%, 2.5%, or 1%, (by dry weight) of contaminating protein or polysaccharide or other cellular material. When the polypeptide/protein is recombinantly produced, it is also preferably substantially free of culture medium, i.e., culture medium represents less than about 20%, 10%, or 5% of the volume of the protein preparation. When polypeptide/protein or polysaccharide is produced by chemical synthesis, it is preferably substantially free of chemical precursors or other chemicals, i.e., it is separated from chemical precursors or other chemicals which are involved in the synthesis of the protein or polysaccharide. Accordingly, such preparations of the polypeptide/protein or polysaccharide have less than about 30%, 20%, 10%, 5% (by dry weight) of chemical precursors or compounds other than polypeptide/protein or polysaccharide fragment of interest.

[0099] A "non-conservative amino acid substitution" refers to the substitution of one or more of the amino acid residues of a protein with other amino acid residues

having dissimilar physical and/or chemical properties, using the characteristics defined above.

[0100] The term "pharmaceutically acceptable carrier" means a carrier approved by a regulatory agency of a Federal, a state government, or other regulatory agency, or listed in the U.S. Pharmacopeia or other generally recognized pharmacopeia for use in animals, including humans as well as non-human mammals. The term "carrier" refers to a diluent, adjuvant, excipient, or vehicle with which the pharmaceutical composition is administered. Such pharmaceutical carriers can be sterile liquids, such as water and oils, including those of petroleum, animal, vegetable or synthetic origin. Water, saline solutions and aqueous dextrose and glycerol solutions can be employed as liquid carriers, particularly for injectable solutions. Suitable pharmaceutical excipients include starch, glucose, lactose, sucrose, gelatin, malt, rice, flour, chalk, silica gel, sodium stearate, glycerol monostearate, talc, sodium chloride, dried skim milk, glycerol, propylene, glycol, water, ethanol and the like. The composition, if desired, can also contain minor amounts of wetting, bulking, emulsifying agents, or pH buffering agents. These compositions can take the form of solutions, suspensions, emulsion, sustained release formulations and the like. Examples of suitable pharmaceutical carriers are described in "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E. W. Martin. The formulation should suit the mode of administration.

[0101] The terms "protein", "polypeptide" and "peptide" refer to a polymer of amino acid residues and are not limited to a minimum length of the product. Thus, peptides, oligopeptides, dimers, multimers, and the like, are included within the definition. Both full-length proteins and fragments thereof are encompassed by the definition. The terms also include modifications, such as deletions, additions and substitutions (generally conservative in nature, but which may be non-conservative), to a native sequence, preferably such that the protein maintains the ability to elicit an immunological response within an animal to which the protein is administered. Also included are post-expression modifications, *e.g.* glycosylation, acetylation, lipidation, phosphorylation and the like.

[0102] A "protective" immune response refers to the ability of an immunogenic composition to elicit an immune response, either humoral or cell mediated, which

serves to protect the subject from an infection. The protection provided need not be absolute, i.e., the infection need not be totally prevented or eradicated, if there is a statistically significant improvement compared with a control population of subjects, *e.g.* infected animals not administered the vaccine or immunogenic composition. Protection may be limited to mitigating the severity or rapidity of onset of symptoms of the infection. In general, a "protective immune response" would include the induction of an increase in antibody levels specific for a particular antigen in at least 50% of subjects, including some level of measurable functional antibody responses to each antigen. In particular situations, a "protective immune response" could include the induction of a two fold increase in antibody levels or a four fold increase in antibody levels specific for a particular antigen in at least 50% of subjects, including some level of measurable functional antibody responses to each antigen. In certain embodiments, opsonising antibodies correlate with a protective immune response. Thus, protective immune response may be assayed by measuring the percent decrease in the bacterial count in an opsonophagocytosis assay, for instance those described below. Preferably, there is a decrease in bacterial count of at least 10%, 25%, 50%, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% or more.

[0103] The term "recombinant" as used herein simply refers to any protein, polypeptide, or cell expressing a gene of interest that is produced by genetic engineering methods. The term "recombinant" as used with respect to a protein or polypeptide, means a polypeptide produced by expression of a recombinant polynucleotide. The proteins used in the immunogenic compositions of the invention may be isolated from a natural source or produced by genetic engineering methods, such as, for example recombinant ClfA, recombinant ClfB or recombinant MntC. "Recombinant," as used herein, further describes a nucleic acid molecule, which, by virtue of its origin or manipulation, is not associated with all or a portion of the polynucleotide with which it is associated in nature. The term "recombinant" as used with respect to a host cell means a host cell into which a recombinant polynucleotide has been introduced.

[0104] Recombinant ClfA (rClfA) and recombinant ClfB (rClfB) as used herein refers to forms of ClfA or ClfB for use in the immunogenic compositions of the

invention. In one embodiment, rClfA is a fragment of ClfA comprising one or more of the N domains, for example, N1N2N3, N2N3, N2 or N3 and is referred to herein as "recombinant ClfA" or "rClfA". In one embodiment, rClfB is a fragment of ClfB comprising one or more of the N domains of ClfB, for example, N1N2N3, N2N3, N2 or N3 and is referred to herein as "recombinant ClfB" or "rClfB".

[0105] The term "subject" refers to a mammal, bird, fish, reptile, or any other animal. The term "subject" also includes humans. The term "subject" also includes household pets. Non-limiting examples of household pets include: dogs, cats, pigs, rabbits, rats, mice, gerbils, hamsters, guinea pigs, ferrets, birds, snakes, lizards, fish, turtles, and frogs. The term "subject" also includes livestock animals. Non-limiting examples of livestock animals include: alpaca, bison, camel, cattle, deer, pigs, horses, llamas, mules, donkeys, sheep, goats, rabbits, reindeer, yak, chickens, geese, and turkeys.

[0106] As used herein, "treatment" (including variations thereof, for example, "treat" or "treated") refers to any one or more of the following: (i) the prevention of infection or reinfection, as in a traditional vaccine, (ii) the reduction in the severity of, or, in the elimination of symptoms, and (iii) the substantial or complete elimination of the pathogen or disorder in question. Hence, treatment may be effected prophylactically (prior to infection) or therapeutically (following infection). In the present invention, prophylactic or therapeutic treatments can be used. According to a particular embodiment of the present invention, compositions and methods are provided which treat, including prophylactically and/or therapeutically immunize, a host animal against a microbial infection (*e.g.* a bacterium such as *Staphylococcus* species). The methods of the present invention are useful for conferring prophylactic and/or therapeutic immunity to a subject. The methods of the present invention can also be practiced on subjects for biomedical research applications.

[0107] The terms "vaccine" or "vaccine composition", which are used interchangeably, refer to pharmaceutical compositions comprising at least one immunogenic composition that induces an immune response in an animal.

General Description

[0108] The present invention relates to immunogenic compositions comprising at least three antigens from a staphylococcal organism, for example *S. aureus*. The antigens may be isolated from the organism using biochemical isolation procedures, or they may be produced synthetically or by recombinant means. The antigens may be polypeptides, or polysaccharides, or a combination thereof. These immunogenic compositions may be used in the manufacture of a vaccine to immunize subjects against infections caused by a staphylococcal organism. The components suitable for use in these compositions are described in greater detail below.

Staphylococcal Immunogenic Compositions

[0109] *S. aureus* is the causative agent of a wide variety of human diseases ranging from superficial skin infections to life threatening conditions such as pneumonia, sepsis and endocarditis. See Lowy N. Eng. J. Med. 339:580-532(1998). In cases of invasive disease, *S. aureus* can be isolated from normally sterile body sites including blood, cerebral spinal fluid CSF, pleural fluid, pericardial fluid, peritoneal fluid, joint/synovial fluid, bone, internal body site (lymph node, brain, heart, liver, spleen, vitreous fluid, kidney, pancreas, ovary), or other normally sterile sites. This can lead to life threatening clinical conditions such as bacteremia, pneumonia, cellulitis, osteomyelitis, endocarditis, and septic shock. Adults, elderly and pediatric patients are most at risk for *S. aureus* infections.

[0110] Embodiments of the present invention describe selected antigens in immunogenic compositions including an isolated *S. aureus* clumping factor A (ClfA) polypeptide, an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 5 conjugated to a carrier protein, an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 8 conjugated to a carrier protein, an isolated *S. aureus* clumping factor B (ClfB), and recombinant *S. aureus* MntC protein. Next, the antigens were characterized in immunogenic compositions as a series of combinations, to demonstrate that specific combinations provide immune responses that may be superior to that produced using individual components for immunogenic compositions.

Accordingly, one combination provides an immunogenic composition comprising: an isolated *S. aureus* clumping factor A (ClfA) polypeptide, an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 5 conjugated to a carrier protein, and an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 8 conjugated to a carrier protein. A second combination provides an immunogenic composition comprising: an isolated *S. aureus* clumping factor A (ClfA) polypeptide, an isolated *S. aureus* clumping factor B (ClfB), isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 5 conjugated to a carrier protein, and an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 8 conjugated to a carrier protein. A third combination provides an immunogenic composition comprising: an isolated *S. aureus* clumping factor A (ClfA) polypeptide, an isolated *S. aureus* clumping factor B (ClfB) polypeptide, an isolated *S. aureus* MntC protein, an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 5 conjugated to a carrier protein, and an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 8 conjugated to a carrier protein. A fourth combination provides an immunogenic composition comprising: an isolated *S. aureus* clumping factor A (ClfA) polypeptide, an isolated *S. aureus* MntC protein, an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 5 conjugated to a carrier protein, and an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 8 conjugated to a carrier protein. A fifth combination provides an immunogenic composition comprising: an isolated *S. aureus* clumping factor B (ClfB) polypeptide, an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 5 conjugated to a carrier protein, and an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 8 conjugated to a carrier protein. A sixth combination provides an immunogenic composition comprising: an isolated *S. aureus* clumping factor B (ClfB) polypeptide, an isolated *S. aureus* MntC protein, an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 5 conjugated to a carrier protein, and an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 8 conjugated to a carrier protein. A seventh combination provides an immunogenic composition comprising: an isolated *S. aureus* MntC protein, an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 5 conjugated to a carrier protein, and an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 8 conjugated to a carrier protein. An eighth combination provides an immunogenic composition comprising: an isolated *S. aureus* clumping factor A (ClfA) polypeptide, an isolated *S. aureus* clumping factor B (ClfB) polypeptide,

and an isolated *S. aureus* MntC protein. In some embodiments, the above combinations further comprise at least one of the following antigens: EkeS, DsqA, KesK, KrkN, KrkN2, RkaS, RrkN, KnkA, SdrC, SdrD, SdrE, Opp3a, DltD, HtsA, LtaS, IsdA, IsdB, IsdC, SdrF, SdrG, SdrH, SrtA, SpA, Sbi alpha-hemolysin (hla), beta-hemolysin, fibronectin-binding protein A (fnbA), fibronectin-binding protein B (fnbB), coagulase, Fig, map, Panton-Valentine leukocidin (pvl), alpha-toxin and its variants, gamma-toxin (hlg) and variants, ica, immunodominant ABC transporter, Mg2+ transporter, Ni ABC transporter, RAP, autolysin, laminin receptors, IsaA/PisA, IsaB/PisB , SPOIIIE, SsaA, EbpS, Sas A, SasF, SasH, EFB (FIB), SBI, Npase, EBP, bone sialo binding protein II, aureolysin precursor (AUR)/Sepp1, Cna, and fragments thereof such as M55, TSST-1, mecA, poly-N-acetylglucosamine (PNAG/dPNAG) exopolysaccharide, GehD, EbhA, EbhB, SSP-1, SSP-2, HBP, vitronectin binding protein, HarA, EsxA, EsxB, Enterotoxin A, Enterotoxin B, Enterotoxin C1, and novel autolysin.

[0111] Epidemiological studies of *S. aureus* outbreaks indicate that evolution of *S. aureus* is clonal in nature, where a single clone that acquired a successful genotype has spread rapidly and caused many of the infections. Therefore, evolution is considered to be clonal. The bacterial genome is comprised of a larger more stable species core genome and a more diversified set of accessory genes. See Feil et al., Nature Reviews: Microbiology 2:483-495 (2004). The core genes are ubiquitously present in all clones of the species, and the accessory genes are not necessarily present in any given clone. Considering *S. aureus*, one study using a DNA microarray representing more than 90% of the *S. aureus* genome found that 78% of the genes in the genome was common to all *S. aureus* thus representing the "species core", and the remaining 22% are the "accessory genes". The accessory genes comprise dispensable genetic material much of which codes for virulence factors, proteins mediating antibiotic resistance and genes coding for proteins specific for interacting with a particular host environment. See Fitzgerald et al., PNAS 98:8821-8826 (2001); Feil et al., Nature Reviews: Microbiology 2:483-495 (2004). In general, the core genes are more slowly evolving and the accessory genes are polymorphic. See Kuhn et al., J. Bact. 188:169-178 (2006). Therefore,

appropriately selected core genes provide better target antigens for use in immunogenic compositions to prevent infection.

[0112] Surface expressed antigens from disease-causing isolates or clonal types of *S. aureus* offer a source for antigens able to induce immunity and functional antibodies. At the macromolecular level (either amino acid or polysaccharide sequence), conserved forms of the antigen expressed by the different disease isolates may be chosen to permit broad cross reactivity of antibodies to those strains that may possess antigenic variations of the vaccine target.

[0113] One important consideration for including an antigen in the multi-antigen immunogenic compositions described herein is whether the antigen has demonstrated efficacy when administered as an immunogenic composition by providing protection in one or more animal models of bacterial infection. There are numerous animal models for various *S. aureus* diseases. Each of these models has strengths and weaknesses.

[0114] Human clearance of bacterial infections can proceed via opsonic killing that is mediated after phagocyte uptake. There are many convincing examples for this from studies using Gram-positive polysaccharide antigens, such as Streptococcus pneumoniae capsular polysaccharide and *S. aureus* capsular polysaccharide. See Lee et al., Crit. Rev. Micro. 29:333-349 (2003). There is less evidence for opsonic activity induced by Gram-positive protein antigens. Uptake by phagocytes has been observed, but direct killing has been harder to demonstrate. Monoclonal antibodies to proteins have been shown to confer protection against *S. aureus* challenge in animal models of infection; and mechanisms other than opsonophagocytic killing may account for the protection observed.

[0115] The induction of antibodies having a measurable functional activity, such as opsonophagocytic activity (OPA) is one indicator of whether a particular antigen is useful for inclusion in the immunogenic compositions of the present invention. Other indicators include but are not limited to antigen expression on the cell surface during in vivo expression as measured using antigen specific antibodies or the ability of antibodies to inhibit/neutralize antigen function.

Species/ strains

[0116] The type of any particular hospital or disease strain is useful for determining the origin, clonal relatedness and monitoring the epidemiology of outbreaks. Numerous methods are available for typing *S. aureus* strains. The classical practical definition for a bacterial species is a group of strains that are characterized by over 70% genomic hybridization (DNA-DNA genomic hybridization of DDH) and over 97% of 16S ribosomal RNA gene sequence identity. See Vandamme et al., Microbiol. Rev. 60:407-438 (1996). Bacteriophage typing (BT) is a method of typing *S. aureus* strains based on their susceptibility to lysis by certain phage types. See Blair et al., Bull. W.H.O. 24:771-784 (1961). This older method suffers from a lack of reproducibility between laboratories and a failure to type 15-20% of isolates.

Single-Antigen vs Multi-Antigen Immunogenic Compositions

[0117] The question arises as to whether the optimal immunogenic composition to protect against infection of the predominant *S. aureus* strains should be comprised of a single component or multiple components. Numerous studies have shown that immunogenic compositions based on a single protein or carbohydrate component can offer some protection from challenge with a strain of *S. aureus* expressing that component in certain animal models. Importantly, it has also been demonstrated that protection from a single antigen can be dependent on the strain selected.

[0118] Surface proteins such as adhesins have been investigated as single component vaccines. For example, mice immunized with *S. aureus* ClfA developed less severe arthritis than did mice with a control protein. See Josefsson et al., J. Infect. Dis. 184:1572-1580 (2001). Fragments of the collagen binding adhesin (*cna*) offered protection in a mouse sepsis model. See Nilsson, et al., J. Clin. Invest., 101:2640-2649 (1998). Immunization of mice with the A domain of ClfB could reduce nasal colonization in a mouse model. See Schaffer et al., Infect. Immun. 74:2145-2153 (2006).

[0119] One of the fourteen *S. aureus* iron sequestering proteins known as IsdB is being investigated in a monovalent immunogenic formulation for protection from

S. aureus infection. This protein has shown a good protective effect in mice and good immunogenicity in non-human primates. See Kuklin et al., Infect. Immun. 74:2215-2223 (2006).

[0120] Due to the vast potential of *S. aureus* to evolve or substitute different proteins to perform the same or similar functions, the optimal immunogenic formulation for protecting the most people from the most *S. aureus* diseases is a multi-antigen formulation comprising 2 or more (e.g., 3, 4, 5, etc.) antigens properly selected and presented in an immunogenic formulation. In certain embodiments, an immunogenic composition of the invention comprises three or more antigens selected from an isolated *S. aureus* clumping factor A (ClfA) polypeptide, an isolated *S. aureus* clumping factor B (ClfB) polypeptide, an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 5 (CP5) conjugated to a carrier protein, an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 8 (CP8) conjugated to a carrier protein and an isolated *S. aureus* MntC protein. In certain embodiments, an immunogenic composition of the invention comprises four or more antigens selected from an isolated *S. aureus* clumping factor A (ClfA) polypeptide, an isolated *S. aureus* clumping factor B (ClfB) polypeptide, an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 5 (CP5) conjugated to a carrier protein, an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 8 (CP8) conjugated to a carrier protein and an isolated *S. aureus* MntC protein. In certain embodiments, an immunogenic composition of the invention comprises an isolated *S. aureus* clumping factor A (ClfA) polypeptide, an isolated *S. aureus* clumping factor B (ClfB) polypeptide, an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 5 (CP5) conjugated to a carrier protein, an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 8 (CP8) conjugated to a carrier protein and an isolated *S. aureus* MntC protein as antigens.

Adjuvants

[0121] Immunogenic compositions as described herein also comprise, in certain embodiments, one or more adjuvants. An adjuvant is a substance that enhances the immune response when administered together with an immunogen or antigen. A number of cytokines or lymphokines have been shown to have immune modulating activity, and thus are useful as adjuvants, including, but not limited to, the interleukins 1-α, 1-β, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 (see, *e.g.*, U.S. Patent No. 5,723,127),

13, 14, 15, 16, 17 and 18 (and its mutant forms); the interferons-α, β and γ; granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) (see, *e.g.*, U.S. Patent No. 5,078,996 and ATCC Accession Number 39900); macrophage colony stimulating factor (M-CSF); granulocyte colony stimulating factor (G-CSF); and the tumor necrosis factors α and β. Still other adjuvants that are useful with the immunogenic compositions described herein include chemokines, including without limitation, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, and RANTES; adhesion molecules, such as a selectin, *e.g.*, L-selectin, P-selectin and E-selectin; mucin-like molecules, *e.g.*, CD34, GlyCAM-1 and MadCAM-1; a member of the integrin family such as LFA-1, VLA-1, Mac-1 and p150.95; a member of the immunoglobulin superfamily such as PECAM, ICAMs, *e.g.*, ICAM-1, ICAM-2 and ICAM-3, CD2 and LFA-3; co-stimulatory molecules such as B7-1, B7-2,CD40 and CD40L; growth factors including vascular growth factor, nerve growth factor, fibroblast growth factor, epidermal growth factor, PDGF, BL-1, and vascular endothelial growth factor; receptor molecules including Fas, TNF receptor, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, and DR6; and Caspase (ICE).

[0122] Suitable adjuvants used to enhance an immune response further include, without limitation, MPL™ (3-O-deacylated monophosphoryl lipid A, Corixa, Hamilton, MT), which is described in U.S. Patent No. 4,912,094. Also suitable for use as adjuvants are synthetic lipid A analogs or aminoalkyl glucosamine phosphate compounds (AGP), or derivatives or analogs thereof, which are available from Corixa (Hamilton, MT), and which are described in United States Patent No. 6,113,918. One such AGP is 2-[(R)-3-Tetradecanoyloxytetradecanoyl-amino] ethyl 2-Deoxy-4-O-phosphono-3-O-[(R)-3-tetradecanoyoxytetradecanoyl]-2-[(R)-3-tetradecanoyloxytetradecanoyl-amino]-b-D-glucopyranoside, which is also known as 529 (formerly known as RC529). This 529 adjuvant is formulated as an aqueous form (AF) or as a stable emulsion (SE).

[0123] Still other adjuvants include muramyl peptides, such as N-acetyl-muramyl-L-threonyl-D-isoglutamine (thr-MDP), N-acetyl-normuramyl-L-alanine-2-(1'-2' dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-hydroxyphosphoryloxy)-ethylamine (MTP-PE); oil-in-water emulsions, such as MF59 (U.S. Patent No. 6,299,884) (containing 5%

Squalene, 0.5% polysorbate 80, and 0.5% Span 85 (optionally containing various amounts of MTP-PE) formulated into submicron particles using a microfluidizer such as Model 110Y microfluidizer (Microfluidics, Newton, MA)), and SAF (containing 10% Squalene, 0.4% polysorbate 80, 5% pluronic-blocked polymer L121, and thr-MDP, either microfluidized into a submicron emulsion or vortexed to generate a larger particle size emulsion); incomplete Freund's adjuvant (IFA); aluminum salts (alum), such as aluminum hydroxide, aluminum phosphate, aluminum sulfate; Amphigen; Avridine; L121/squalene; D-lactide-polylactide/glycoside; pluronic polyols; killed *Bordetella*; saponins, such as Stimulon™ QS-21 (Antigenics, Framingham, MA.), described in U.S. Patent No. 5,057,540, ISCOMATRIX (CSL Limited, Parkville, Australia), described in U.S. Patent No. 5,254,339, and immunostimulating complexes (ISCOMATRIX); *Mycobacterium tuberculosis*; bacterial lipopolysaccharides; synthetic polynucleotides such as oligonucleotides containing a CpG motif (*e.g.*, U.S. Patent No. 6,207,646); IC-31 (Intercell AG, Vienna, Austria), described in European Patent Nos. 1,296,713 and 1,326,634; a pertussis toxin (PT) or mutant thereof, a cholera toxin or mutant thereof (*e.g.*, U.S. Patent Nos. 7,285,281, 7,332,174, 7,361,355 and 7,384,640); or an *E. coli* heat-labile toxin (LT) or mutant thereof, particularly LT-K63, LT-R72 (*e.g.*, U.S. Patent Nos. 6,149,919, 7,115,730 and 7,291,588).

Candidate Antigens:

ClfA: Domain organization

[0124] Clumping factor A (ClfA) is a *S. aureus* surface protein associated with binding to host matrix proteins via a fibrinogen binding site. ClfA is a member of a family of proteins containing the carboxyl terminal LPXTG (SEQ ID NO: 125) motif that enables the protein to become covalently linked to the cell surface. ClfA also belongs to another family of proteins (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecule, or MSCRAMMs) that are associated with binding host proteins such as fibrinogen (bound by ClfA), the fibronectin binding proteins (FnbA and FnbB), the collagen binding protein (Cna) and others. These proteins all share the amino terminal signal sequence that mediates transport to the

cell surface. The MSCRAMMs also include an A-domain that is the functional region containing the active site for ligand binding (*e.g.*, fibrinogen, fibronectin, elastin, keratin). The A-domain is followed by a region composed of serine aspartate repeats (SD repeat), which is thought to span the peptidoglycan layer. The SD repeat is followed by a membrane-spanning region that includes the LPXTG (SEQ ID NO: 125) motif for covalent linkage of the protein to peptidoglycan. ClfA is described in U.S. Pat. No. 6,008,341.

[0125] The ligand binding region of ClfA comprising N1N2N3 of the A domain (Figure 1) spans amino acids 40-559. The N domains of ClfA have been assigned as follows: N1 encompasses residues 45-220; N2 encompasses residues 229-369; and N3 encompasses residues 370-559. See Deivanayagam et al. EMBO J. 21:6660-6672 (2002). For ease of reference the N1N2N3 domains may be referred to as N123, likewise N2N3 may be referred to as N23. In preparations of recombinant N1N2N3, the N1 domain has been found to be protease sensitive and is easily cleaved or hydrolyzed to leave the N2N3 as a stable ligand binding recombinant fragment. See Deivanayagam et al. EMBO J. 21:6660-6672 (2002). The crystal structure of the fibrinogen binding N2N3 fragment of ClfA A domain, revealed that both N2 and N3 are dominated by anti-parallel beta strands. In addition to the anti-parallel beta strands, the N2 domain contains a single turn alpha helix and two 3_{10} helices and the N3 domain contains three 3_{10} helices. See Deivanayagam et al. EMBO J. 21:6660-6672 (2002). Sequence alignment of N2 and N3 reveals only 13% sequence identity and 36% sequence similarity over their lengths. See Deivanayagam et al. EMBO J. 21:6660-6672 (2002). The topology of the N2 and N3 domains are similar to the classic IgG fold and have been proposed to be novel variants of the IgG fold. See Deivanayagam et al. EMBO J. 21:6660-6672 (2002).

ClfA Sequence

[0126] The gene for clumping factor protein A, designated ClfA, has been cloned, sequenced and analyzed in detail at the molecular level (McDevitt et al., Mol. Microbiol. 11: 237-248 (1994); McDevitt et al., Mol. Microbiol. 16:895-907 (1995)). The sequence identifiers for the amino acid sequences of ClfA from 111 *S. aureus* disease-causing isolates are shown in Table 10. The amino acid

sequence of the full length (including the signal sequence) wild type ClfA from *S. aureus* strain PFESA0237, is shown in SEQ ID NO: 130. This sequence shows a tyrosine at position 338, which is changed to an alanine in the mutated form of ClfA. The full length gene encoding the wild type ClfA from *S. aureus* strain PFESA0237, comprising the N123 region, the repeat region and the anchor region is shown in SEQ ID NO: 131. The amino acid sequence of the Y338A mutated forms of ClfA is shown in SEQ ID NO: 123. However, it should be noted that the change from a tyrosine to an alanine, which occurs in the wild type ClfA at position 338 of SEQ ID NO: 130, and which is designated as Y338A, is shown in the mutated form of ClfA, in SEQ ID NO: 123 at position 310. Furthermore, the mutated form of ClfA shown in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 123 is the mature form of ClfA without the signal sequence, thus accounting for the difference in position of this mutation between SEQ ID NO: 130 and SEQ ID NO: 123.

ClfB: Domain Organization

[0127] ClfB is a *S. aureus* protein having fibrinogen binding activity and triggers *S. aureus* to form clumps in the presence of plasma. ClfB is an MSCRAMM protein and displays the characteristic MSCRAMM domain organization including an A-domain that is the functional region containing the active site for ligand binding (*e.g.*, fibrinogen, fibronectin, elastin, keratin). The A-domain is followed by a region composed of serine aspartate repeats (SD repeat), which is thought to span the peptidoglycan layer. The SD repeat is followed by a membrane-spanning region that includes the LPXTG (SEQ ID NO: 125) motif for covalent linkage of the protein to peptidoglycan. ClfB is described in WO 99/27109 and in US patent 6,680,195.

[0128] The internal organization of ClfB N-terminal A domain is very similar organization as found in ClfA. The A domain is composed of three subdomains N1, N2, and N3. The ligand binding region of ClfB comprising N1N2N3 of the A domain (Figure 1) spans amino acids 44-585. For ease of reference the N1N2N3 domains may be referred to as N123, likewise N2N3 may be referred to as N23. The N domains of ClfB have been assigned as follows: N1 encompasses residues 44_{-197}; N2 encompasses residues 198-375; and N3 encompasses residues 375-585.

In ClfA, the crystal structure of the A domain was found to have a unique version of the immunoglobulin fold and by analogy the same may be speculated to be the case for ClfB. See Deivanayagam et al., EMBO J. 21:6660-6672 (2002). Even though organization of the A domains of ClfB and ClfA are similar, sequence identity is only 26%. See Ni Eidhin et al., Mol. Microbiol. 30:245-257 (2002).

ClfB Sequence

[0129] The gene encoding ClfB is classified as a core adhesion gene. ClfB sequences from 92 strains of *S. aureus* associated with multiple disease states are summarized in Table 11. Additional sequences were obtained from GenBank.

Other MSCRAMMS

[0130] Other MSCRAMMS may be considered for use in an immunogenic composition of the present invention. For example, the serine-aspartate repeat (Sdr) proteins, SdrC, SdrD, and SdrE are related in primary sequence and structural organization to the ClfA and ClfB proteins and are localized on the cell surface. The SdrC, SdrD and SdrE proteins are cell wall-associated proteins, having a signal sequence at the N-terminus and an LPXTG (SEQ ID NO:125) motif, hydrophobic domain and positively charged residues at the C-terminus. Each also has an SD repeat containing region R of sufficient length to allow, along with the B motifs, efficient expression of the ligand binding domain region A on the cell surface. With the A region of the SdrC, SdrD and SdrE proteins located on the cell surface, the proteins can interact with proteins in plasma, the extracellular matrix or with molecules on the surface of host cells. The Sdr proteins share some limited amino acid sequence similarity with ClfA and ClfB. Like ClfA and ClfB, SdrC, SdrD and SdrE also exhibit cation-dependent ligand binding of extracellular matrix proteins.

[0131] The sdr genes are closely linked and tandemly arrayed. The Sdr proteins (of SdrC, SdrD, SdrE, ClfA, and ClfB) characteristically comprise an A region where there is highly conserved amino acid sequence that can be used to derive a consensus TYTFTDYVD (SEQ ID NO: 126) motif. The motif exhibits slight variation between the different proteins. This variation, along with the consensus sequence of the motif is described in US patent number 6,680,195. In the Clf-Sdr

proteins, this motif is highly conserved. The motif can be used in immunogenic compositions to impart broad spectrum immunity to bacterial infections, and also can be used as an antigen in the production of monoclonal or polyclonal antibodies. Such an antibody can be used to impart broad spectrum passive immunity.

[0132] The Sdr proteins differ from ClfA and ClfB by having two to five additional 110-113 residue repeated sequences (B-motifs) located between region A and the R-region. Each B-motif contains a consensus Ca^{2+} -binding EF-hand loop normally found in eukaryotic proteins. The structural integrity of a recombinant protein comprising the five B-repeats of SdrD was shown by bisANS fluorescence analysis to be Ca^{2+} -dependent, suggesting that the EF-hands are functional. When Ca^{2+} was removed the structure collapsed to an unfolded conformation. The original structure was restored by addition of Ca^{2+}. The C-terminal R-domains of the Sdr proteins contain 132-170 SD residues. These are followed by conserved wall-anchoring regions characteristic of many surface proteins of Gram positive bacteria.

[0133] In the Sdr and Clf proteins this B motif is highly conserved while a degenerate version occurs in fibronectin binding MSCRAMMS, as well as the collagen binding protein Cna. The B motifs, in conjunction with the R regions, are necessary for displaying the ligand-binding domain at some distance from the cell surface. The repeated B motifs are one common denominator of the sub-group of SD repeat proteins described herein. These motifs are found in different numbers in the three Sdr proteins from strain PFESA0237. There are clear distinctions between the individual B motifs. The most conserved units are those located adjacent to the R regions (SdrC B2, SdrD B5 and SdrE B3). They differ from the rest at several sites, especially in the C-terminal half. A noteworthy structural detail is that adjacent B repeats are always separated by a proline residue present in the C-terminal region, but a proline never occurs between the last B repeats and the R region. Instead this linker is characterized by a short acidic stretch. These differences are evidence that the end units have a different structural or functional role compared to the other B motifs. The N-terminal B motifs of SdrD and SdrE have drifted apart from the others, and there are numerous amino acid alterations,

including small insertions and deletions whereas the remaining internal B motifs are more highly conserved. Note that each of the three Sdr proteins has at least one B motif of each kind.

[0134] The C-terminal R-domains of the Sdr proteins contain 132-170 SD residues. These are followed by conserved wall-anchoring regions characteristic of many surface proteins of Gram positive bacteria.

[0135] Other candidate SdrD molecules may be derived from various species of organisms for use in an immunogenic composition of the invention, some of which include the following SdrD from *S. aureus*: strain USA300 FPR3757 (protein accession number SAUSA300 0547); strain NCTC8325 (protein accession number SAOUHSC 00545); strain MW2 (protein accession number MW0517); strain MSSA476 (protein accession number SAS0520; and strain Mu50 (protein accession number SAV0562).

[0136] Further MSCRAMMS which may be considered for use in an immunogenic composition of the present invention include EkeS, DsqA, KesK, KrkN, KrkN2, RkaS, RrkN, and KnkA. These MSCRAMMS are described in WO 02/102829, which is hereby incorporated by reference. Additional MSCRAMMS, identified by GenBank Accession No., include NP_373261.1, NP_373371.1, NP_374246.1, NP_374248.1, NP_374841.1, NP_374866.1, NP_375140.1, NP_375614.1, NP_375615.1, NP_375707.1, NP_375765.1, and NP_375773.1.

Capsule Polysaccharides Type 5 and Type 8

[0137] Staphylococcal microorganisms capable of causing invasive disease generally also are capable of producing a capsule polysaccharide (CP) that encapsulates the bacterium and enhances its resistance to clearance by host innate immune system. The CP serves to cloak the bacterial cell in a protective capsule that renders the bacteria resistant to phagocytosis and intracellular killing. Bacteria lacking a capsule are more susceptible to phagocytosis. Capsular polysaccharides are frequently an important virulence factor for many bacterial pathogens, including *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* and Group B streptococci.

[0138] The capsule polysaccharide can be used to serotype a particular species of bacteria. Typing is usually accomplished by reaction with a specific antiserum or monoclonal antibody generated to a specific structure or unique epitope characteristic of the capsule polysaccharide. Encapsulated bacteria tend to grow in smooth colonies whereas colonies of bacteria that have lost their capsules appear rough. Colonies producing a mucoid appearance are known as Heavily Encapsulated. Types 1 and 2 of *S. aureus* are heavily encapsulated and are rarely associated with disease.

[0139] Most clinical isolates of *S. aureus* are encapsulated with either serotypes 5 or 8. The type 5 (CP5) and type 8 (CP8) capsular polysaccharides have similar trisaccharide repeating units comprised of N-acetyl mannosaminuronic acid, N-acetyl L-fucosamine, and N-acetyl D-fucosamine. See Fournier, J.M. et al., Infect. Immun. 45:97-93 (1984) and Moreau, M., et al., Carbohydrate Res. 201:285-297 (1990). The two CPs, which have the same sugars, but differ in the sugar linkages and in sites of O acetylation to produce serologically distinct patterns of immunoreactivity.

[0140] In some embodiments, the serotype 5 and/or 8 capsular polysaccharides of the invention are O-acetylated. In some embodiments, the degree of O-acetylation of type 5 capsular polysaccharide or oligosaccharide is 10-100%, 20-100%, 30-100%, 40-100%, 50-100%, 60-100%, 70-100%, 80-100%, 90-100%, 50- 90%, 60-90%, 70-90% or 80-90%. In some embodiments, the degree of O-acetylation of type 8 capsular polysaccharide or oligosaccharide is 10-100%, 20-100%, 30-100%, 40-100%, 50-100%, 60-100%, 70-100%, 80-100%, 90-100%, 50-90%, 60-90%, 70-90% or 80-90%. In some embodiments, the degree of O-acetylation of type 5 and type 8 capsular polysaccharides or oligosaccharides is 10-100%, 20-100%, 30-100%, 40-100%, 50-100%, 60-100%, 70-100%, 80-100%, 90-100%, 50-90%, 60-90%, 70-90% or 80-90%.

[0141] The degree of O-acetylation of the polysaccharide or oligosaccharide can be determined by any method known in the art, for example, by proton NMR (Lemercinier and Jones 1996, Carbohydrate Research 296; 83-96, Jones and Lemercinier 2002, J Pharmaceutical and Biomedical Analysis 30; 1233-1247, WO

05/033148 or WO 00/56357). Another commonly used method is described by Hestrin (1949) J. Biol. Chem. 180; 249-261.

[0142] In some embodiments, the serotype 5 and/or 8 capsular polysaccharides of the invention are used to generate antibodies that are functional as measured by the killing of bacteria in an animal efficacy model or an opsonophagocytic killing assay that demonstrates that the antibodies kill the bacteria. Such functionality may not be observed using an assay that monitors the generation of antibodies alone, which is not indicative of the importance of O-acetylation in efficacy.

Capsule Epidemiology

[0143] The association of particular capsule serotypes with disease is possible through monitoring of clinical isolates. Of the eight different serotypes of *S. aureus* identified (Karakawa and Vann (1982) only serotypes 1 and 2 are heavily encapsulated, and these are rarely isolated. See Capsular Polysaccharides of *Staphylococcus aureus*, p. 285-293, In J.B. Robbins, J.C. Hill and J.C. Sadoff (ed.), Seminars in infectious disease, vol. 4, Bacterial Vaccines. Thieme Stratton, Inc. New York). Surveys have shown that approximately 85-90% of *S. aureus* clinical isolates express CP5 or CP8 (Arbeit RD, et al., Diagn. Microbiol. Infect. Dis. (1984) Apr;2(2):85-91; Karakawa WW, et al., J. Clin. Microbiol. (1985) Sep;22(3):445-7; Essawi T, et al., Trop. Med. Int. Health. (1998) Jul;3(7):576-83; Na'was T, et al., J. Clin. Microbiol. (1998) 36(2):414-20. Most of CP5 and CP8 non-typeable strains are genetically type 5 or type 8 containing mutations in *cap5/8* locus (Cocchiaro, Gomez et al., (2006), Mol. Microbiol. Feb. 59(3):948-960). Capsulation for some strains is lost rapidly within few passages *in vitro* which is due to a repressive effect of high phosphate concentration in media used in clinical diagnosis on capsule production. It was also reported that non-capsulated isolates recover capsule expression after passing through cows. See Opdebeek, J.P. et al., J. Med. Microbiol. 19:275-278 (1985). Some non-typeable strains become capsule positive under appropriate growth conditions.

CP5 and CP8 Structure

[0144] The repeat unit of both CP5 and CP8 is comprised of 2-acetamido-2-deoxy-D-mannuronic acid, 2-acetamido-2-deoxy-L-fucose and 2-acetamido-2-

deoxy-D-fucose. See C. Jones et al., Carbohydr. Res. 340:1097-1106 (2005). Although CP5 and CP8 have the same sugar composition, they have been demonstrated to be immunologically distinct. They differ in glycosidic linkages and site of O-acetylation of uronic acid. Strain dependent incomplete N-acetylation of one of the FucNAc residues was observed. See Tzianabos et al., PNAS V98: 9365(2001).

S. aureus *Capsule Polysaccharide in an Immunogenic Composition*

[0145] The molecular weight of the *S. aureus* capsule polysaccharides is an important consideration for use in immunogenic compositions. High molecular weight capsule polysaccharides are able to induce certain antibody immune responses due to a higher valency of the epitopes present on the antigenic surface. The methods described herein provide for isolation and purification of much higher molecular weight capsule polysaccharide type 5 and type 8 than was previously available.

MntC/SitC /Saliva Binding Protein

[0146] MntC/SitC /Saliva Binding Protein is an ABC transporter protein and has homologues in *S. epidermidis* and *S. aureus*. It is referred to in the present invention as MntC. This protein is a 32 kDa lipoprotein and is located in the bacterial cell wall. See Sellman et al., and Cockayne et al., Infect. Immun. 66: 3767(1998). In *S. epidermidis*, it is a component of an iron-regulated operon. It shows considerable homology to both adhesins including FimA of *S. parasanguis*, and with lipoproteins of a family of ABC transporters with proven or putative metal iron transport functions. (See Table 12 for strains of *S. aureus* and sequences.)

S. aureus *MntC protein*

[0147] The *S. aureus* homologue of MntC is known as saliva binding protein and was disclosed in U.S. Pat. No. 5,801,234 and can be included in an immunogenic composition of the invention. The protein sequence for the *S. aureus* homologue of MntC/SitC/Saliva Binding Protein is found in GenBank accession number NP_371155 for strain Mu50. (Also known as SAV0631.) The sequence identifier

is SEQ ID NO: 119. The accession number for the nucleotide sequence for the complete genome of strain Mu50 is NC_002758.2 (coordinates 704988-705917).

S. epidermidis *SitC protein*

[0148] The *S. epidermidis* homologue of MntC/SitC/Saliva Binding Protein is known as SitC and was disclosed in Sellman et al., (Sellman et al., Infect. Immun. 2005 October; 73(10): 6591- 6600). The protein sequence for the *S. epidermidis* homologue of MntC/SitC/Saliva Binding Protein is found in GenBank accession number YP_187886.1. (Also known as SERP0290.). The sequence identifier is SEQ ID NO: 121.

[0149] The accession number for the nucleotide sequence for the complete genome of strain RP62A, is NC_002976 (coordinates 293030-293959). Other candidate SitC molecules may be derived from various species of organisms for use in an immunogenic composition of the invention, some of which are listed in Table 1 below.

Table 1

Protein	Species	Example strain	Protein Accession
SitC	S. haemolyticus	JCSC1435	BAE03450.1
SitC	S. epidermidis	ATCC 12228	AAO04002.1
SitC	S. saprophyticus	ATCC 15305	BAE19233.1
SitC	S. xylosus	DSM20267	ABR57162.1
SitC	S. carnosus	TM300	CAL27186.1

S. aureus Iron Binding Proteins

[0150] Another potential candidate antigen to be considered for use in the immunogenic compositions of the invention include the *S. aureus* surface protein iron surface determinant B (IsdB). This MSCRAMM was described by Mazmanian et al. (Mazmanian, SK et al. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 99:2293-2298 (2002)) and it has subsequently been tested and shown to be effective as a vaccine candidate in a murine model of infection and a rhesus macaque immunogenicity study by Kuklin, et al. (Kuklin, NA, et al. Infection and Immunity, Vol. 74, No. 4, 2215-2223, (2006)). This IsdB molecule is present in various strains of *S. aureus*, including strain MRSA252 (protein accession number CAG40104.1); strain

Newman (protein accession number BAF67312.1); strain MSSA476 (protein accession number CAG42837.1); strain Mu3 (protein accession number BAF78003.1); strain RF122 (protein accession number CAI80681.1).

Candidate Antigens:

[0151] The immunogenic compositions of the present invention may also include one or more of the following antigens: Opp3a, DltD, HtsA, LtaS, IsdA, IsdC, SdrF, SdrG, SdrH, SrtA, SpA, Sbi alpha-hemolysin (hla), beta-hemolysin, fibronectin-binding protein A (fnbA), fibronectin-binding protein B (fnbB), coagulase, Fig, map, Panton-Valentine leukocidin (pvl), alpha-toxin and its variants, gamma-toxin (hlg) and variants, ica, immunodominant ABC transporter, Mg2+ transporter, Ni ABC transporter, RAP, autolysin, laminin receptors, IsaA/PisA, IsaB/PisB , SPOIIIE, SsaA, EbpS, Sas A, SasF, SasH, EFB (FIB), SBI, Npase, EBP, bone sialo binding protein II, aureolysin precursor (AUR)/Sepp1, Cna, and fragments thereof such as M55, TSST-1, mecA, poly-N-acetylglucosamine (PNAG/dPNAG) exopolysaccharide, GehD, EbhA, EbhB, SSP-1, SSP-2, HBP, vitronectin binding protein, HarA, EsxA, EsxB, Enterotoxin A, Enterotoxin B, Enterotoxin C1, and novel autolysin. In certain embodiments of the invention, when the immunogenic composition comprises certain forms of CP5 and/or CP8, it may not further comprise PNAG.

Immunogenic Composition Formulations

[0152] In one embodiment, the immunogenic compositions of the invention further comprise at least one of an adjuvant, a buffer, a cryoprotectant, a salt, a divalent cation, a non-ionic detergent, an inhibitor of free radical oxidation, a diluent or a carrier.

[0044] The immunogenic compositions of the invention may further comprise one or more preservatives in addition to a plurality of staphylococcal protein antigens and capsular polysaccharide-protein conjugates. The FDA requires that biological products in multiple-dose (multi-dose) vials contain a preservative, with only a few exceptions. Vaccine products containing preservatives include vaccines containing benzethonium chloride (anthrax), 2-phenoxyethanol (DTaP, HepA, Lyme, Polio (parenteral)), phenol (Pneumo, Typhoid (parenteral), Vaccinia) and

thimerosal (DTaP, DT, Td, HepB, Hib, Influenza, JE, Mening, Pneumo, Rabies). Preservatives approved for use in injectable drugs include, e.g., chlorobutanol, m-cresol, methylparaben, propylparaben, 2-phenoxyethanol, benzethonium chloride, benzalkonium chloride, benzoic acid, benzyl alcohol, phenol, thimerosal and phenylmercuric nitrate.

[0153] Formulations of the invention may further comprise one or more of a buffer, a salt, a divalent cation, a non-ionic detergent, a cryoprotectant such as a sugar, and an anti-oxidant such as a free radical scavenger or chelating agent, or any multiple combination thereof. The choice of any one component, e.g., a chelator, may determine whether or not another component (e.g., a scavenger) is desirable. The final composition formulated for administration should be sterile and/or pyrogen free. The skilled artisan may empirically determine which combinations of these and other components will be optimal for inclusion in the preservative containing immunogenic compositions of the invention depending on a variety of factors such as the particular storage and administration conditions required.

[0154] In certain embodiments, a formulation of the invention which is compatible with parenteral administration comprises one or more physiologically acceptable buffers selected from, but not limited to, Tris (trimethamine), phosphate, acetate, borate, citrate, glycine, histidine and succinate. In certain embodiments, the formulation is buffered to within a pH range of about 6.0 to about 9.0, preferably from about 6.4 to about 7.4.

[0155] In certain embodiments, it may be desirable to adjust the pH of the immunogenic composition or formulation of the invention. The pH of a formulation of the invention may be adjusted using standard techniques in the art. The pH of the formulation may be adjusted to be between 3.0 and 8.0. In certain embodiments, the pH of the formulation may be, or may adjusted to be, between 3.0 and 6.0, 4.0 and 6.0, or 5.0 and 8.0. In other embodiments, the pH of the formulation may be, or may adjusted to be, about 3.0, about 3.5, about 4.0, about 4.5, about 5.0, about 5.5, about 5.8, about 6.0, about 6.5, about 7.0, about 7.5, or about 8.0. In certain embodiments, the pH may be, or may adjusted to be, in a range from 4.5 to 7.5, or from 4.5 to 6.5, from 5.0 to 5.4, from 5.4 to 5.5, from 5.5

to 5.6, from 5.6 to 5.7, from 5.7 to 5.8, from 5.8 to 5.9, from 5.9 to 6.0, from 6.0 to 6.1, from 6.1 to 6.2, from 6.2 to 6.3, from 6.3 to 6.5, from 6.5 to 7.0, from 7.0 to 7.5 or from 7.5 to 8.0. In a specific embodiment, the pH of the formulation is about 5.8.

[0156] In certain embodiments, a formulation of the invention which is compatible with parenteral administration comprises one or more divalent cations, including but not limited to $MgCl_2$, $CaCl_2$ and $MnCl_2$, at a concentration ranging from about 0.1 mM to about 10 mM, with up to about 5 mM being preferred.

[0157] In certain embodiments, a formulation of the invention which is compatible with parenteral administration comprises one or more salts, including but not limited to sodium chloride, potassium chloride, sodium sulfate, and potassium sulfate, present at an ionic strength which is physiologically acceptable to the subject upon parenteral administration and included at a final concentration to produce a selected ionic strength or osmolarity in the final formulation. The final ionic strength or osmolality of the formulation will be determined by multiple components (e.g., ions from buffering compound(s) and other non-buffering salts. A preferred salt, NaCl, is present from a range of up to about 250 mM, with salt concentrations being selected to complement other components (e.g., sugars) so that the final total osmolarity of the formulation is compatible with parenteral administration (e.g., intramuscular or subcutaneous injection) and will promote long term stability of the immunogenic components of the immunogenic composition formulation over various temperature ranges. Salt-free formulations will tolerate increased ranges of the one or more selected cryoprotectants to maintain desired final osmolarity levels.

[0158] In certain embodiments, a formulation of the invention which is compatible with parenteral administration comprises one or more cryoprotectants selected from but not limited to disaccharides (e.g., lactose, maltose, sucrose or trehalose) and polyhydroxy hydrocarbons (e.g., dulcitol, glycerol, mannitol and sorbitol).

[0159] In certain embodiments, the osmolarity of the formulation is in a range of from about 200 mOs/L to about 800 mOs/L, with a preferred range of from about 250 mOs/L to about 500 mOs/L, or about 300 mOs/L - about 400 mOs/L. A

salt-free formulation may contain, for example, from about 5% to about 25% sucrose, and preferably from about 7% to about 15%, or about 10% to about 12% sucrose. Alternatively, a salt-free formulation may contain, for example, from about 3% to about 12% sorbitol, and preferably from about 4% to 7%, or about 5% to about 6% sorbitol. If salt such as sodium chloride is added, then the effective range of sucrose or sorbitol is relatively decreased. These and other such osmolality and osmolarity considerations are well within the skill of the art.

[0160] In certain embodiments, a formulation of the invention which is compatible with parenteral administration comprises one or more free radical oxidation inhibitors and/or chelating agents. A variety of free radical scavengers and chelators are known in the art and apply to the formulations and methods of use described herein. Examples include but are not limited to ethanol, EDTA, a EDTA/ethanol combination, triethanolamine, mannitol, histidine, glycerol, sodium citrate, inositol hexaphosphate, tripolyphosphate, ascorbic acid/ascorbate, succinic acid/succinate, malic acid/maleate, desferal, EDDHA and DTPA, and various combinations of two or more of the above. In certain embodiments, at least one non-reducing free radical scavenger may be added at a concentration that effectively enhances long term stability of the formulation. One or more free radical oxidation inhibitors/chelators may also be added in various combinations, such as a scavenger and a divalent cation. The choice of chelator will determine whether or not the addition of a scavenger is needed.

[0161] In certain embodiments, a formulation of the invention which is compatible with parenteral administration comprises one or more non-ionic surfactants, including but not limited to polyoxyethylene sorbitan fatty acid esters, Polysorbate-80 (Tween 80), Polysorbate-60 (Tween 60), Polysorbate-40 (Tween 40) and Polysorbate-20 (Tween 20), polyoxyethylene alkyl ethers, including but not limited to Brij 58, Brij 35, as well as others such as Triton X-100; Triton X-114, NP40, Span 85 and the Pluronic series of non-ionic surfactants (e.g., Pluronic 121), with preferred components Polysorbate-80 at a concentration from about 0.001% to about 2% (with up to about 0.25% being preferred) or Polysorbate-40 at a concentration from about 0.001% to 1% (with up to about 0.5% being preferred).

[0162] In certain embodiments, a formulation of the invention comprises one or more additional stabilizing agents suitable for parenteral administration, e.g., a reducing agent comprising at least one thiol (-SH) group (e.g., cysteine, N-acetyl cysteine, reduced glutathione, sodium thioglycolate, thiosulfate, monothioglycerol, or mixtures thereof). Alternatively or optionally, preservative-containing immunogenic composition formulations of the invention may be further stabilized by removing oxygen from storage containers, protecting the formulation from light (e.g., by using amber glass containers).

[0163] Preservative-containing immunogenic composition formulations of the invention may comprise one or more pharmaceutically acceptable carriers or excipients, which includes any excipient that does not itself induce an immune response. Suitable excipients include but are not limited to macromolecules such as proteins, saccharides, polylactic acids, polyglycolic acids, polymeric amino acids, amino acid copolymers, sucrose (Paoletti et al, 2001, *Vaccine*, 19:2118), trehalose, lactose and lipid aggregates (such as oil droplets or liposomes). Such carriers are well known to the skilled artisan. Pharmaceutically acceptable excipients are discussed, e.g., in Gennaro, 2000, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, ISBN:0683306472.

[0164] Compositions of the invention may be lyophilized or in aqueous form, i.e. solutions or suspensions. Liquid formulations may advantageously be administered directly from their packaged form and are thus ideal for injection without the need for reconstitution in aqueous medium as otherwise required for lyophilized compositions of the invention.

[0165] Direct delivery of immunogenic compositions of the present invention to a subject may be accomplished by parenteral administration (intramuscularly, intraperitoneally, intradermally, subcutaneously, intravenously, or to the interstitial space of a tissue); or by rectal, oral, vaginal, topical, transdermal, intranasal, ocular, aural, pulmonary or other mucosal administration. In a preferred embodiment, parenteral administration is by intramuscular injection, e.g., to the thigh or upper arm of the subject. Injection may be via a needle (e.g., a hypodermic needle), but needle free injection may alternatively be used. A typical intramuscular dose is 0.5mL. Compositions of the invention may be prepared in

various forms, e.g., for injection either as liquid solutions or suspensions. In certain embodiments, the composition may be prepared as a powder or spray for pulmonary administration, e.g., in an inhaler. In other embodiments, the composition may be prepared as a suppository or pessary, or for nasal, aural or ocular administration, e.g., as a spray, drops, gel or powder.

[0166] Optimal amounts of components for a particular immunogenic composition may be ascertained by standard studies involving observation of appropriate immune responses in subjects. Following an initial vaccination, subjects can receive one or several booster immunizations adequately spaced.

Packaging and Dosage Forms

[0167] Immunogenic compositions of the invention may be packaged in unit dose or multi-dose form (e.g. 2 doses, 4 doses, or more). For multi-dose forms, vials are typically but not necessarily preferred over pre-filled syringes. Suitable multi-dose formats include but are not limited to: 2 to 10 doses per container at 0.1 to 2 mL per dose. In certain embodiments, the dose is a 0.5 mL dose. See, e.g., International Patent Application WO2007/127668, which is incorporated by reference herein.

Compositions may be presented in vials or other suitable storage containers, or may be presented in pre-filled delivery devices, e.g., single or multiple component syringes, which may be supplied with or without needles. A syringe typically but need not necessarily contains a single dose of the preservative-containing immunogenic composition of the invention, although multi-dose, pre-filled syringes are also envisioned. Likewise, a vial may include a single dose but may alternatively include multiple doses.

[0168] Effective dosage volumes can be routinely established, but a typical dose of the composition for injection has a volume of 0.5 mL. In certain embodiments, the dose is formulated for administration to a human subject. In certain embodiments, the dose is formulated for administration to an adult, teen, adolescent, toddler or infant (i.e., no more than one year old) human subject and may in preferred embodiments be administered by injection.

[0169] Liquid immunogenic compositions of the invention are also suitable for reconstituting other immunogenic compositions which are presented in lyophilized

form. Where an immunogenic composition is to be used for such extemporaneous reconstitution, the invention provides a kit with two or more vials, two or more ready-filled syringes, or one or more of each, with the contents of the syringe being used to reconstitute the contents of the vial prior to injection, or vice versa.

[0170] Alternatively, immunogenic compositions of the present invention may be lyophilized and reconstituted, e.g., using one of a multitude of methods for freeze drying well known in the art to form dry, regular shaped (e.g., spherical) particles, such as micropellets or microspheres, having particle characteristics such as mean diameter sizes that may be selected and controlled by varying the exact methods used to prepare them. The immunogenic compositions may further comprise an adjuvant which may optionally be prepared with or contained in separate dry, regular shaped (e.g., spherical) particles such as micropellets or microspheres. In such embodiments, the present invention further provides an immunogenic composition kit comprising a first component that includes a stabilized, dry immunogenic composition, optionally further comprising one or more preservatives of the invention, and a second component comprising a sterile, aqueous solution for reconstitution of the first component. In certain embodiments, the aqueous solution comprises one or more preservatives, and may optionally comprise at least one adjuvant (see, e.g., WO2009/109550 (incorporated herein by reference).

[0171] In yet another embodiment, a container of the multi-dose format is selected from one or more of the group consisting of, but not limited to, general laboratory glassware, flasks, beakers, graduated cylinders, fermentors, bioreactors, tubings, pipes, bags, jars, vials, vial closures (e.g., a rubber stopper, a screw on cap), ampoules, syringes, dual or multi-chamber syringes, syringe stoppers, syringe plungers, rubber closures, plastic closures, glass closures, cartridges and disposable pens and the like. The container of the present invention is not limited by material of manufacture, and includes materials such as glass, metals (e.g., steel, stainless steel, aluminum, etc.) and polymers (e.g., thermoplastics, elastomers, thermoplastic-elastomers). In a particular embodiment, the container of the format is a 5 mL Schott Type 1 glass vial with a butyl stopper. The skilled artisan will appreciate that the format set forth above is by no means an exhaustive list, but

merely serve as guidance to the artisan with respect to the variety of formats available for the present invention: Additional formats contemplated for use in the present invention may be found in published catalogues from laboratory equipment vendors and manufacturers such as United States Plastic Corp. (Lima, OH), VWR.

Evaluation of Immunogenic Compositions

[0172] In one embodiment, the present invention provides immunogenic compositions comprising at least three antigens from a *S. aureus* organism.

[0173] Various *in vitro* tests are used to assess the immunogenicity of the immunogenic compositions of the invention. For example, an *in vitro* opsonic assay is conducted by incubating together a mixture of staphylococcal cells, heat inactivated serum containing specific antibodies to the antigens in question, and an exogenous complement source. Opsonophagocytosis proceeds during incubation of freshly isolated polymorphonuclear cells (PMN's) or differentiated effector cells such as HL60s and the antibody/complement/staphylococcal cell mixture. Bacterial cells that are coated with antibody and complement are killed upon opsonophagocytosis. Colony forming units (cfu) of surviving bacteria that are recovered from opsonophagocytosis are determined by plating the assay mixture. Titers are reported as the reciprocal of the highest dilution that gives 50% bacterial killing, as determined by comparison to assay controls.

[0174] A whole cell ELISA assay is also used to assess *in vitro* immunogenicity and surface exposure of the antigen, wherein the bacterial strain of interest (*S. aureus*) is coated onto a plate, such as a 96 well plate, and test sera from an immunized animal is reacted with the bacterial cells. If any antibody, specific for the test antigen, is reactive with a surface exposed epitope of the antigen, it can be detected by standard methods known to one skilled in the art.

[0175] Any antigen demonstrating the desired *in vitro* activity is then tested in an *in vivo* animal challenge model. In certain embodiments, immunogenic compositions are used in the immunization of an animal (*e.g.*, a mouse) by methods and routes of immunization known to those of skill in the art (*e.g.*, intranasal, parenteral, oral, rectal, vaginal, transdermal, intraperitoneal, intravenous, subcutaneous, etc.). Following immunization of the animal with a particular *Staphylococcus sp.* immunogenic composition, the animal is challenged

with a *Staphylococcus sp.* and assayed for resistance to the staphylococcal infection.

[0176] In one embodiment, pathogen-free mice are immunized and challenged with *S. aureus*. For example, mice are immunized with one or more doses of the desired antigen in an immunogenic composition. Subsequently, the mice are challenged with *S. aureus* and survival is monitored over time post challenge.

Methods of Immunizing

[0177] Provided also are methods for immunizing a host to prevent staphylococcal infection. In a preferred embodiment, the host is human. Thus, a host or subject is administered an immunogenic amount of an immunogenic composition as described herein. An immunogenic amount of an immunogenic composition can be determined by doing a dose response study in which subjects are immunized with gradually increasing amounts of the immunogenic composition and the immune response analyzed to determine the optimal dosage. Starting points for the study can be inferred from immunization data in animal models. The dosage amount can vary depending upon specific conditions of the individual. The amount can be determined in routine trials by means known to those skilled in the art. In some embodiments, the method of immunizing a host to prevent staphylococcal infection, disease or condition comprises human, veterinary, animal, or agricultural treatment. Another embodiment provides a method of immunizing a host to prevent staphylococcal infection, disease or condition associated with a *Staphylococcus sp.* in a subject, the method comprising generating a polyclonal or monoclonal antibody preparation from the immunogenic composition described herein, and using said antibody preparation to confer passive immunity to the subject.

[0178] An immunologically effective amount of the immunogenic composition in an appropriate number of doses is administered to the subject to elicit an immune response. The treated individual should not exhibit the more serious clinical manifestations of the staphylococcal infection. The dosage amount can vary depending upon specific conditions of the individual, such as age and weight. This amount can be determined in routine trials by means known to those skilled in the art.

[0179] In one embodiment, patients being administered immunogenic compositions of the invention show a reduction in *S. aureus* carriage rates. Such reduction in carriage or a prolonged interval of time spent as a non-carrier following administration of an immunogenic composition is significant from a medical need perspective. For example, reduction in overall *S. aureus* carriage in carriers may be assessed following one dose of *S. aureus* multi-antigen vaccine. For example, 1 day prior to administration of an immunogenic composition, a group of adults aged 18-50 years may be screened for carriage by nasal and throat swabs followed by cultivation to determine their carriage state. Next, the group can be administered an immunogenic composition of the invention with a group receiving a control. Nasal and throat swabs performed weekly over a 12 week period, and monthly up to 6 months post administration of the immunogenic composition are performed and compared to placebo. One primary endpoint is to compare carriage rates in patients after administration of an immunogenic composition versus placebo at 3 month intervals post immunization.

Animal Models of Staphylococcal Infection

[0180] Several animal models are described below for use in assessing the efficacy of any one of the immunogenic compositions described herein.

Murine Sepsis Model (Passive or Active)

Passive Immunization Model

[0181] Mice are passively immunized intraperitoneally (i.p.) with immune IgG or monoclonal antibody. The mice are subsequently challenged 24 hours later with a lethal dose of *S. aureus*. The bacterial challenge is administered intravenously (i.v.) or i.p. ensuring that any survival could be attributed to the specific *in vivo* interaction of the antibody with the bacteria. The bacterial challenge dose is determined to be the dose required to achieve lethal sepsis of approximately 20% of the unimmunized control mice. Statistical evaluation of survival studies can be carried out by Kaplan-Meier analysis.

Active Immunization Model

[0182] In this model, mice (e.g. Swiss Webster mice) are actively immunized intraperitoneally (i.p.) or subcutaneously (s.c.) with a target antigen at 0, 3 and 6 weeks (or other similar appropriately spaced vaccination schedule) and subsequently challenged with *S. aureus* at week 8 by the intravenous route. The bacterial challenge dose is calibrated to achieve approximately 20% survival in the control group over a 10-14 day period. Statistical evaluation of survival studies can be carried out by Kaplan-Meier analysis.

Infectious Endocarditis Model (Passive or Active)

[0183] A passive immunization model for infectious endocarditis (IE) caused by *S. aureus* has previously been used to show that ClfA can induce protective immunity. See Vernachio et al., Antmicro. Agents & Chemo. 50:511-518 (2006). In this model of IE, rabbits or rats are used to simulate clinical infections that include a central venous catheter, bacteremia, and hematogenous seeding to distal organs. Catheterized rabbits or rats with sterile aortic valve vegetations are administered a single or multiple intravenous injection of a monoclonal or polyclonal antibody specific for the target antigen. Subsequently, the animals are challenged i.v. with a *S. aureus* or *S. epidermidis* strain. Then after challenge, heart, cardiac vegetations, and additional tissues, including kidneys, and blood are harvested and cultured. The frequency of staphylococcal infection in cardiac tissue, kidneys, and blood is then measured. In one study, when animals were challenged with either MRSE ATCC 35984 or MRSA 67-0, significant reductions in infection rate were shown using either the polyclonal antibody preparation or the monoclonal antibody to ClfA. See Vernachio et al., Antmicro. Agents & Chemo. 50:511-518 (2006).

[0184] The infectious endocarditis model has also been adapted for active immunization studies in both rabbits and rats. Rabbits or rats are immunized intramuscularly or subcutaneously with target antigen and challenged with *S. aureus* two weeks later via the intravenous route.

Pyelonephritis Model

[0185] In the pyelonephritis model, mice are immunized on wks 0, 3 and 6 (or other appropriately spaced immunization schedule) with the target antigens. Subsequently, the animals are challenged i.p. or i.v. with *S. aureus* PFESA0266. After 48 hrs, the kidneys are harvested and bacterial CFU are enumerated.

Antibodies and Antibody Compositions

[0186] The invention further provides antibodies and antibody compositions which bind specifically and selectively to one or more antigens of an immunogenic composition of the present invention. In some embodiments, antibodies are generated upon administration to a subject of an immunogenic composition of the present invention. In some embodiments, the invention provides purified or isolated antibodies directed against one or more of the antigens of an immunogenic composition of the present invention. In some embodiments, the antibodies of the present invention are functional as measured by killing bacteria in either an animal efficacy model or via an opsonophagocytic killing assay. In some embodiments, the antibodies of the invention confer passive immunity to a subject. The present invention further provides polynucleotide molecules encoding an antibody or antibody fragment of the invention, and a cell or cell line (such as hybridoma cells or other engineered cell lines for recombinant production of antibodies) and a transgenic animal that produces an antibody or antibody composition of the invention, using techniques well-known to those of skill in the art.

[0187] Antibodies or antibody compositions of the invention may be used in a method of treating or preventing a Staphylococcal infection, disease or condition associated with a *Staphylococcus sp.* in a subject, the method comprising generating a polyclonal or monoclonal antibody preparation, and using said antibody or antibody composition to confer passive immunity to the subject. Antibodies of the invention may also be useful for diagnostic methods, e.g., detecting the presence of or quantifying the levels of one or more antigens of the immunogenic compositions of the present invention.

EXAMPLES

[0188] The following examples demonstrate some embodiments of the present invention. However, it is to be understood that these examples are for illustration only and do not purport to be wholly definitive as to conditions and scope of this invention. It should be appreciated that when typical reaction conditions (*e.g.*, temperature, reaction times, etc.) have been given, the conditions both above and below the specified ranges can also be used, though generally less conveniently. All parts and percents referred to herein are on a weight basis and all temperatures are expressed in degrees centigrade unless otherwise specified.

[0189] Furthermore, the following examples were carried out using standard techniques, which are well known and routine to those of skill in the art, except where otherwise described in detail. As noted above, the following examples are presented for illustrative purpose, and should not be construed in any way limiting the scope of this invention.

Example 1: Production of Antigens ClfA and ClfB

[0190] Clumping factor A (ClfA) and B (ClfB) are *S. aureus* surface proteins responsible for binding to host proteins including fibrinogen (ClfA, ClfB) and cytokeratin 10 (ClfB). ClfA and ClfB are members of a family of proteins containing the carboxyl terminal LPXTG (SEQ ID NO: 125) motif that enables the protein to become covalently linked to the cell surface. Both ClfA and ClfB belong to family of proteins (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecule, or MSCRAMMs) that recognize and bind host extracellular matrix proteins such as fibrinogen (ClfA and ClfB), fibronectin (FnbA and FnbB), collagen (Cna), and others. These proteins all share the amino terminal signal sequence that mediates transport to the cell surface. The MSCRAMMs also include an A-domain that is the functional region containing ligand-binding site for fibrinogen, fibronectin, elastin, and keratin. The A-domain can be followed by a region composed of serine-aspartate repeats (SD repeat), which is thought to span the peptidoglycan layer. The SD repeat is followed by a membrane-spanning region that includes the LPXTG (SEQ ID NO: 125) motif for covalent linkage of the protein to peptidoglycan.

[0191] The ligand binding regions of ClfA and ClfB comprising N1N2N3 of the A domain spans amino acids 40-559. The N domains of ClfA / ClfB have been assigned as follows: N1 encompasses residues 45-220; N2 encompasses residues 229-369; and N3 encompasses residues 370-559. See Deivanayagam et al. EMBO J. 21:6660-6672 (2002). In preparations of recombinant ClfA N1N2N3, the N1 domain has been found to be protease sensitive and is easily cleaved or hydrolyzed to leave the N23 as a stable ligand binding recombinant fragment. See Deivanayagam et al. EMBO J. 21:6660-6672 (2002). Similarly, it was demonstrated that N1 domain of ClfB is also protease-sensitive and could be easily cleaved by *S. aureus* metalloprotease (McAleese, F. M. et al. J. Biol. Chem. 2001, 276, pp. 29969-29978). The crystal structure of the fibrinogen binding N23 fragment of ClfA A domain, revealed that both N2 and N3 are dominated by anti-parallel beta strands. In addition to the anti-parallel beta strands, the N2 domain contains a single turn alpha helix and two 3_{10} helices and the N3 domain contains three 3_{10} helices. See Deivanayagam et al. EMBO J. 21:6660-6672 (2002).

[0192] Sequence alignment of N2 and N3 reveals only 13% sequence identity and 36% sequence similarity over their lengths. See Deivanayagam et al. EMBO J. 21:6660-6672 (2002). The topology of the N2 and N3 domains are similar to the classic IgG fold and have been proposed to be novel variants of the IgG fold. See Deivanayagam et al. EMBO J. 21:6660-6672 (2002).

Recombinant forms of ClfA used in the immunogenic compositions described herein are fragments of ClfA comprising one or more of the N domains, for example, N1N2N3, N2N3 and are referred to herein as "recombinant ClfA" or "rClfA". In addition, any rClfA should be one that maintains the native structure of the individual N domains and critical epitopes but does not interfere with normal processes of the immunized individual after administration (i.e., does not bind fibrinogen). Mutational studies have shown that mutating Y338A (N2) completely eliminated binding of the N23 fragment to fibrinogen. (This Y338A position refers to a change from a tyrosine to an alanine at position 338 in the immature form of the polypeptide sequence with the leader sequence still attached. This change can be seen at position 310 in the mature form of the mutated ClfA polypeptide of SEQ ID NO: 123 that demonstrates a lack of binding to fibrinogen). See Deivanayagam

et al. EMBO J. 21:6660-6672 (2002). Therefore, the Y338A mutation has been adopted for all fragments of ClfA in the following studies.

[0193] Similarly, recombinant forms of ClfB used in the immunogenic compositions described herein are fragments of ClfB comprising one or more of the N domains, for example, N1N2N3, N2N3 and are referred to herein as "recombinant ClfB" or "rClfB". In addition, any rClfB should be one that maintains the native structure of the individual N domains and critical epitopes but does not interfere with normal processes of the immunized individual after administration (i.e., does not bind fibrinogen). (See, for example, Walsh, E.J. et al. Microbiology (2008), 154, 550-558).

ClfA and ClfB: Overview of Cloning Strategy

[0194] The different forms of rClfA protein used to generate preclinical efficacy data include $HisClfA_{(N123)}$; $T7ClfA_{(N123)}$; $T7ClfA_{(N123)}$; Y338A; $ClfA_{(N23)}$ and $ClfA_{(N23)}$Y338A. See Figure 1. The ClfA gene contains the A region coding sequence from *S. aureus* PFESA0237 corresponding to residues 40-559. The reading frame cloned from *S. aureus* was fused to the N-terminal HisTag and linker sequences of the vector (MRGSHHHHHHGS SEQ ID NO: 127) along with three additional coding sequences (KLN) introduced at the C-terminus. (See below for detailed procedure.) Protein expressed from this vector was used for all experiments where it is referred to as $HisClfA_{(N123)}$.

[0195] The different forms of rClfA were derived from the A region (residues 40-559 of ClfA expressed by *S. aureus* PFESA0237 (top row). The $HisClfA_{(N123)}$ is expressed using the T5 promoter contained in pQE30 and all other forms are expressed using the T7 based pET expression system.

[0196] Two forms of ClfB (T7ClfB N1N2N3 and ClfB N23) were utilized for preclinical animal studies.

ClfA Cloning Procedure

[0197] The ClfA coding sequence corresponding to amino acid residues 40-559 from *S. aureus* strain PFESA0237 was cloned and the mutation, Y338A, was introduced to eliminate fibrinogen binding. The mutated ClfA gene was introduced into a T7 RNA polymerase expression vector, pET9a (Novagen) to provide

plasmid, pLP1179. The DNA sequence of the region comprising the T7 promoter and coding region in pLP1179 is SEQ ID:124. The expression vector was transformed into *E. coli* BLR(DE3) (Novagen) for production of recombinant ClfA.

[0198] The construction of T7ClfA$_{(N123)}$Y338A involved several steps. A summary of the cloning steps used to construct the final expression plasmid, pLP1179 is shown in Figure 2.

[0199] The *clfA* DNA sequence present in pQEClf40 correspond to amino acid residues 40-559 of ClfA that was originally cloned into the BamHI/HindIII cloning site of pQE30. This creates a HisTag fusion at the N-terminal end of ClfA and the addition of three residues at the C-terminus. The ClfA coding region present in (AmpR) pQEClf40 was sub-cloned into the KanR pET 27b vector (Novagen) to create pLP1137. In addition the *clfA* DNA sequence corresponding to amino acid residues 221-559 was cloned into the NdeI-HindIII cloning site of pET27b to create pLP1134. The N-terminal HisTag of ClfA was replaced with the N-terminal T7 by subcloning the BamHI-BlpI DNA fragment from pQEClf40 into pET9a (Novagen) to create pLP1153. The coding sequence of T7ClfA$_{(N123)}$ present in pLP1153 contains 11 N-terminal amino acid residues from the T7 tag of pET9a followed by three amino acid residues from linker sequences plus the three C-terminal linker derived residues originally present in pQE30Clf40. The Y338A mutation was first introduced into the ClfA$_{(N23)}$ coding sequence of pLP1134 to create pLP1168. Later a PstI-SnaBI DNA fragment containing the Y338A mutation from ClfA$_{(N23)}$ of pLP1168 was replaced into PstI-SnaBI of T7ClfA$_{(N123)}$ coding sequence of pLP1153 to create pLP1171. An internal ribosome binding site present in the coding sequence of T7ClfA$_{(N123)}$Y338A of pLP1171 was altered by silent mutations at DNA positions 339 and 342 of the T7 rClfA Y338A ORF, changing from G to T and G to A, respectively. The resulting plasmid, pLP1176, was then used to remove the three extraneous residues, originally derived from pQE30Clf40, between the T7 tag and the start of the ClfA coding region. The three linker derived C-terminal residues were also removed at this time.

[0200] The rClfA expressed by the resulting plasmid, pLP1179 (Figures 2 and 3), contains only the 11 N-terminal amino acids fused to residue 40-559 of

$ClfA_{(N123)}$Y338A. The DNA sequence of the region comprising the T7 promoter and the coding sequence of T7 r$ClfA_{(N123)}$Y338A of pLP1179 is SEQ ID NO 124.

Bacterial Strains and Plasmids

[0201] The plasmid backbone pET9a (obtained from Novagen) was used for construction of pLP1179, which expresses T7$ClfA_{(N123)}$Y338A from a T7 promoter. The plasmid contains the kanamycin resistance gene (KanR) for positive selection. The BL21(DE3) *E. coli* host strain [F- *ompT hsdS*$_B$ ($r_B^- m_B^-$) *gal dcm* (DE3)] (Novagen) was originally used to obtain expression of T7$ClfA_{(N123)}$Y338A. The DE3 designation denotes the lambda lysogen containing the T7 RNA polymerase gene under control of the *lacUV5* (IPTG inducible) promoter that is used for induced expression of T7 RNA polymerase and subsequent transcription from the T7 promoter proximal to the $ClfA_{(N123)}$Y338A coding sequence present in pLP1179. Upon receiving information that the BL21(DE3) lysogenic host strain is capable of inducing lytic phage upon large scale fermentations, the host strain was changed to the *recA* BLR(DE3) host strain [F- *ompT hsdS*$_B$ ($r_B^- m_B^-$) *gal dcm* Δ(*sri-recA*)306::Tn*10*(Tc*R*) (DE3)] (Novagen).

Production and Purification of ClfA

[0202] For the production of ClfA, *E. coli* BLR(DE3)/pLP1179 was grown in defined medium in glucose fed-batch mode in bioreactors. When the culture reached an optical density (OD_{600}) between 30-50, the expression of ClfA was induced by the addition of IPTG. The culture was harvested between 3-16 hours post induction.

[0203] The cells were disrupted and the clarified soluble fraction was collected. After the addition of ammonium sulfate, the material was applied to a column containing Phenyl-Sepharose resin and eluted. Fractions containing ClfA were identified, dialyzed and loaded onto an anion exchange column (Q-Sepharose). After elution with a salt gradient, fractions containing ClfA were identified, concentrated by ultrafiltration and loaded on to a size-exclusion column (Superdex-75). Fractions containing ClfA were identified and pooled. The purity of the ClfA at this point was about 98% as measured by SDS-PAGE.

Cloning and Purification of ClfB N1N2N3

[0204] The ClfB coding sequence corresponding to amino acid residues 44-542 was cloned into a T7 RNA polymerase expression vector, pET28a (Novagen) to provide plasmid pPX1189. The expression vector was transformed into *E. coli* BLR(DE3) (Novagen) for the production of recombinant ClfB. (See Walsh, et al., Microbiology 154: 550-558 (2008).)

[0205] For the production of ClfB, *E. coli* BLR(DE3)/pLP1179 was grown in defined medium in glucose fed-batch mode in bioreactors. When the culture reached an optical density (OD_{600}) between 30-50, the expression of ClfB was induced by the addition of IPTG. The culture was harvested between 3-16 hours post induction.

[0206] The cells were disrupted and the clarified soluble fraction was collected. The pH of the soluble fraction was adjusted to about pH 3.2 and the precipitated impurities were removed. The pH of the soluble fraction containing ClfB was readjusted to about pH 8.0 and dialyzed to remove salts. After the addition of ammonium sulfate, the material was applied to a column containing Phenyl-Sepharose resin and eluted. Fractions containing ClfB were identified, dialyzed and loaded onto an anion exchange column (Q-Sepharose). After elution with a salt gradient, fractions containing ClfB were identified, concentrated by ultrafiltration and loaded on to a size-exclusion column (Superdex-75). Fractions containing ClfB were identified and pooled. The purity of the ClfB at this point was about 94% as measured by SDS-PAGE.

Example 2: Productions of Antigens: *Staph Aureus* MntC

Cloning *S. aureus* Lipidated MntC

[0207] Recombinant MntC was originally cloned from *S. aureus* strain Mu50. The rMntC coding sequence was amplified by PCR from *S. aureus* Mu50 genomic DNA. Two pairs of nested primers were used for the amplification (Table 2). The first pair of primers, 5'SA926-MntC ups and 3'SA926-MntC down, align to the sequence upstream and downstream of the open reading frame of rMntC. The second set of primers align to the coding sequence of rMntC allowing to amplify the sequence corresponding to amino acid residues 19-309. Restriction enzymes

sites were incorporated at the 5' ends of these primers to facilitate directional cloning. PCR was carried out in a Peltier Thermal Cycler (MJ Research Inc, Walthan, MA) with TaKaRa PrimeSTAR HS DNA Polymerase Premix (Takara Bio USA, Madison, WI). PCR product was purified by QIAEX II (Qiagen, Valencia, CA), cleaved with the appropriate restriction endonucleases (New England BioLabs, Ipswich, MA) and sub-cloned into the araBAD promoter-driven expression vector pBAD18Cm. This vector also contains the signal peptide of the lipoprotein P4 from *H. influenza*. The *MntC* PCR product was sub-cloned in frame downstream from the P4 signal peptide to create pLP1194. The DNA sequence of the MntC coding region of pLP1194 is shown in SEQ ID NO: 120. The MntC expressed from pLP1194 is a lipoprotein. The recombinant plasmid DNA was sequenced by ABI PRISM BigDye™ Terminator V.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) and the recombinant protein was expressed in *E. coli* BLR (NOVAGEN) for the production of lipidated rMntC.

Production and Purification of Lipidated MntC

[0208] For the production of lipidated MntC, *E. coli* BLR/pLP1194 was grown in defined medium in glucose fed-batch mode in bioreactors. When the culture reached an optical density (OD_{600}) of about 60, the expression of rMntC was induced by switching the feed to a mixture of glucose and arabinose. The culture was harvested about 24 hours post induction.

[0209] The cells were disrupted and the insoluble fraction was collected. Lipidated MntC was found associated with the cell membranes due to the lipid modification. MntC was extracted from the membrane fraction with a detergent (Zwittergent ZW-312). After removal of the insoluble debris, the lipidated MntC was found in the soluble fraction. The soluble fraction was applied to a column containing a mixed-mode resin and eluted with a linear salt and pH gradient. Fractions containing MntC were identified and pooled. Ammonium sulfate was added to the pool and the material was applied to a column containing Butyl-Sepharose and eluted. Fractions containing MntC were identified, desalted and loaded onto a cation exchange column (SP-Sepharose). After elution with a salt gradient, fractions containing rMntC were identified and pooled.

Cloning *S. aureus* Non-Lipidated MntC

[0210] The DNA sequence employed to express non-lipidated rMntC was isolated by PCR amplification from plasmid pLP1194. The resulting sequence corresponds to amino acid residues 19-309 and does not contain the signal sequence that directs secretion and lipidation. The DNA sequence of the rMntC coding region of pLP1215 is found in DNA SEQ ID NO: 120.

[0211] To create pLP1215, MntC was amplified by PCR from pLP1194. The MntC DNA sequence present in pLP1215 corresponds to amino acid residues 19-309 and the first codon for this construct was introduced in the forward primer used in the amplification of the gene. The primers used for PCR also contain restriction enzymes sites at the 5' ends to facilitate directional cloning (Table 2). PCR and purification of the amplified gene was carried out as described above. Purified PCR product was cleaved with the appropriate restriction endonucleases (New England BioLabs, Ipswich, MA) and sub-cloned into the T7 promoter-driven expression vector pET28a (Novagen, Madison, WI). The recombinant plasmid DNA pLP1215 was sequenced by ABI PRISM BigDye™ Terminator V.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) and the recombinant protein was expressed in *E. coli* BLR(DE3). Plasmid DNA for pLP1215 was purified and used to transform *E. coli* HMS174(DE3) to evaluate protein expression.

Table 2: MntC primers.

Expression constructs	Primer name	Sequence (5'-3')
Lipidated MntC (pLP1194)	5'SA926-MntCups	CAC AAA ATT TAC GAA TAG AAA GAA ACG AG (SEQ ID NO: 109)
	3'SA926-MntCdown	AAA ATA TTG GAG ATA CCA ATA TTT TAG GTT G (SEQ ID NO: 110)
	5'BamHISA926_MntC	TTT CTT GGA TCC GGT ACT GGT GGT AAA CAA AGC AGT G (SEQ ID NO: 111)
	3'SphISA926_MntC	TTT CTT GCA TGC TTA TTT CAT GCT TCC GTG TAC AGT TTC (SEQ ID NO: 112)

Expression constructs	Primer name	Sequence (5'-3')
Non lipidated MntC (pLP1215)	5'NcoIMntC	TTT CTT CCA TGG GTA CTG GTG GTA AAC AAA GCA G (SEQ ID NO: 113)
	3'BlpIMntC	TTT CTT GCT CAG CAT TAT TTC ATG CTT CCG TGT ACA G (SEQ ID NO: 114)

[0212] Synthetic oligonucleotides used to generate rMntC constructs. Restriction endonuclease sites are underlined. The nucleotides in boldface indicate the first codon for the nonlipidated rMntC construct.

Production and Purification of Non-Lipidated rMntC

[0213] For the production of non-lipidated rMntC, *E. coli* HMS174(DE3)/pLP1215 was grown in defined medium in glucose fed-batch mode in bioreactors. When the culture reached an optical density (OD_{600}) of about 60 to 80, the expression of rMntC was induced by addition of IPTG. The culture was harvested about 24 hours post induction. The cells were disrupted and the clarified soluble fraction was collected. The lysate was applied to a column containing a cation exchange resin (SP-Sepharose) and eluted with a linear salt gradient. Fractions containing MntC were identified. After the addition of ammonium sulfate, the material was applied to a column containing Phenyl-Sepharose resin and eluted. After elution, fractions containing rMntC were identified, pooled, and desalted. The purity of the rMntC at this point was >95% as measured by SDS-PAGE.

Example 3: Production of Capsule Polysaccharides CP5 and CP8

[0214] In this example, production of various sizes of *S. aureus* capsule polysaccharides type 5 and 8 is described. The structures of the CP5 and CP8 polysaccharides are shown in Figure 4. The methods described herein are effective in producing CP5 and CP8 with molecular weights ranging from about 50 kDa to 800 kDa. Based on growth characteristics and the quantity of capsule produced, strain PFESA0266 was chosen for CP5 production while strains PFESA0005 or PFESA0286 were used for the production of CP8. The capsules isolated from strains PFESA0005 and PFESA0286 were shown to be identical.

[0215] For production of capsular polysaccharides, the strains were grown in a complex medium consisting primarily of a carbon source (either lactose or sucrose), hydrolyzed soyflour as the nitrogen source, and trace metals. The strains were grown in bioreactors for 2 to 5 days.

[0216] Purification of CP5 and CP8 used for the preparation of conjugates was performed by two different methods that rely on elevated temperature and low pH to effect the release of capsule from the cell and reduce the molecular weight of the polysaccharide. The resulting molecular weight is dependent on the time, temperature and pH of the hydrolysis step.

[0217] Characterization of CP5 and CP8 was performed using the techniques specified in Table 3. Capsule polysaccharides produced by this procedure result in pure polysaccharides with low levels of protein, NA, peptidoglycan and TA contaminants. See Tables 4 and 5.

Table 3: Characterization Assays for Purified *S. aureus* CP5 and CP8

Specificity	Assay
Residual Protein	Lowry colorimetric assay
Residual Nucleic acids	260nm scan
Residual Teichoic Acid	Phosphate colorimetric assay
Residual Peptidoglycan	HPAEC-PAD
Size	SEC-MALLS
Composition	HPAEC-PAD
Identity	HH-NMR or reaction with specific mAb
O-acetylation	HH-NMR
Concentration	MALLS-RI or HPAEC-PAD

[0218] In the first method, following release of the capsule from the cell and reduction of molecular weight, the capsule preparation is treated with a cocktail of enzymes (ribonuclease, deoxyribonuclease, lysozyme, and protease) to digest impurities. After incubation, residual impurities are precipitated by the addition of ethanol (final concentration about 25%). After removal of the residual ethanol, solution containing capsule was loaded onto an anion exchange column (Q-Sepharose) and eluted with a linear salt gradient. Fractions containing capsule

were pooled and treated with sodium meta-periodate. This treatment resulted in the oxidative hydrolysis of residual teichoic acid contaminant, but did not affect the CP5 or CP8. The reaction was quenched by the addition of ethylene glycol. The material was concentrated and diafiltered against dH20 to remove any residual reagents and by-products.

[0219] The second method was used to produce capsules did not involve the use of enzymes to digest the various cell-derived impurities. In this method, following release of the capsule from the cell and reduction of molecular weight the hydrolyzed fermentation broth was clarified by microfiltration followed by ultrafiltration and diafiltration. The solution was treated with activated carbon to remove impurities. After carbon treatment, the material was treated with sodium meta-periodate to oxidize residual teichoic acid followed by quenching with propylene glycol. The material was concentrated and diafiltered against dH_2O to remove any residual reagents and by-products.

[0220] Capsules produced using either method result in pure polysaccharides with low levels of protein, nucleic acid and teichoic acid contaminants. The methods described can be used to produce specific ranges of the desired high molecular weight polysaccharides simply by varying the conditions of hydrolysis. A particularly advantageous range of high molecular weight polysaccharides, ranging from 70 to 150 kDa, is useful in making immunogenic compositions by conjugating polysaccharide to a carrier protein.

[0221] Examples of High Molecular Weight Capsule Polysaccharide obtainable by the methods described herein are shown in Table 4 below. Batches of purified higher MW CP5 also had high purity as indicated by no TA, peptidoglycan and low residual protein. See Table 4. The range of molecular weights in these examples spanned 132.7 kDa to 800 kDa and the purified polysaccharides were highly O-acetylated, ranging from 90-100%, and 100% for N-Acetylation. See Table 4.

[0222] Examples of lower Molecular Weight Capsule Polysaccharide obtainable by the methods described herein are shown in Table 5 below. Batches of purified lower MW CP8 had high purity as indicated by no teichoic acid (TA), peptidoglycan and low residual protein. See Table 5. The range of lower

molecular weights spanned 20.4 kDa to 65.1 kDa and the purified polysaccharides were highly O-acetylated, ranging from 75-96%. The levels of nucleic acid contamination was low, ranging from 0.5-%-2.45%. See Table 5.

Table 4: Characterization of CP5 Preparations

SA CP-5	MW (kDa)	CP (mg/ml)	O-acetyl (%) NMR	Identity NMR	N-acetyl (%) NMR
1	800.1	3.164	100	Pass	100
2	132.7	1.172	90	Pass	100
3	335.4	0.975	90	Pass	100
4	366.8	0.865	90	Pass	ND

Table 5: Characterization of CP8 Preparations

SA CP-8	Total CP Purified mg	MW (kDa) (g/mol)	Protein (Lowry) % (w/w)	NA (260nm scan) % (w/w)	O-Acetyl NMR %
5	310	27.0	1.2	0.94	100
6	438	29.0	2.4	2	100
7	179	20.4	0.37	0.12	108
8	101	46.9	Below Detection	0.5	94
9	91	65.1	1.15	2.45	96
10	578	35.5	2.47	0.65	75

Molecular Weight Selection of Capsular Polysaccharides

[0223] This kinetic analysis demonstrates that a broad range of molecular weights of capsule polysaccharides can be generated by the methods described herein. Initially, larger polysaccharides were produced by the bacterial cells, and subsequently, a desired molecular weight range may be selected and then purified by manipulation of the pH and heat conditions of the heat and hydrolysis steps.

[0224] Heat treatment of *S. aureus* fermentation broth was a process step between fermentation and CP recovery. This process step uses heat to treat pH-adjusted broth for a specified period. The goals of the heat treatment at low pH were to kill cells, inactivate enterotoxins, release cell bound polysaccharide, and reduce molecular weight to the desired size. Among these goals, the reduction of molecular weight was the slowest in terms of processing time required in this step. Therefore, the other goals were inevitably achieved within the treatment time considered.

Heat Treatment

[0225] Temperature and pH conditions for selecting various molecular weight ranges of capsule polysaccharides were determined. The broth pH was adjusted with concentrated sulfuric acid. Then, the broth temperature was raised to the set value. The heat treatment time started as soon as the temperature reached the set point. When the desired treatment time was reached, the broth was cooled to room temperature. In-process samples were taken to determine polysaccharide concentration and molecular weight by HPLC and SEC-MALLS systems, respectively. The MW data was used in the kinetic analysis. The MW profiles were determined over time of CP5 at pH 4.0, 4.5 and 5.0 and CP8 at pH 3.5, 4.0, and 5.0. See Figures 5A and 5B.

[0226] The kinetics of mild acid hydrolysis of polysaccharides was conducted using purified CP-5 and CP-8 obtained from the process. The purified polysaccharide solution was adjusted to the desired pH for the experiment with sulfuric acid. The samples were placed in an oil bath equipped with a precision temperature control system. Each sample was taken out at a predetermined time interval and was quenched in an ice bucket. At the end of the experiment, an aliquot of 1M Tris buffer (pH 7.5) was added to the sample to adjust the pH back to about 7. The samples were analyzed by a SEC-MALLS system. The MW data was used in the kinetic analysis. The effect of temperature on MW profiles of CP5 at pH 4.5 and CP8 at pH 3.5 was determined over time. See Figures 6A and 6B. This acid hydrolysis procedure may be implemented using the fermenter culture or at an intermediate stage of purification or, as shown here, using the purified polysaccharide. Other molecular weight reduction steps, such as sonication or sheer, may be similarly be implemented.

Results

[0227] The effect of pH on the reduction of MW in heat treatment is shown in Figures 5A and 5B for CP-5 and CP-8, respectively. It can be seen that a lower pH was more effective in reducing the size of polysaccharide. The data also suggest that CP-5 was more difficult to hydrolyze than CP-8 at the same pH. Considering the CP8 profiles, ranges of molecular weights between 300 kDa and

600 kDa can be generated using a pH of 5 at 95 °C for between 15 minutes and 120 minutes. Likewise, choosing a pH of 4 at 95 °C for between 15 minutes and 120 minutes can yield CP8 polysaccharide molecular weight ranges between 250 kDa and 450 kDa. In addition, choosing a pH of 3.5 at 95 °C for between 15 minutes and 120 minutes can yield CP8 polysaccharide molecular weight ranges between 120 kDa and 450 kDa.

[0228] The effect of temperature on MW reduction was conducted using the purified polysaccharides recovered from the recovery process. The results are shown in Figures 6A and 6B. As shown, the higher the temperature, the faster the rate of hydrolysis and broader the range of the molecular weights of polysaccharide produced with time. Use of a lower temperature, 55°C versus 95°C at the same pH, produces a narrower range of polysaccharide molecular weights.

[0229] Furthermore, Figure 7 demonstrates the correlation between the molecular weight of purified CP5 and CP8 with the treatment time for mild acid hydrolysis. The purified polysaccharide is the final product obtained from the recovery process detailed previously. As shown in Figure 7, the increase in time of heat treatment of the *S. aureus* PFESA0266 strain at pH 4.5 results in the generation of smaller molecular weight CP5 polysaccharides, whereas shorter heat treatment times at pH 4.5 result in the generation of higher molecular weight CP5 polysaccharides. The size of the CP5 polysaccharides ranged from about 90 kDa to about 220 kDa depending on the length of time of heat treatment at low pH (4.5). Likewise, the increase in time of heat treatment of the *S. aureus* PFESA0005 strain at pH 3.5 results in the generation of smaller molecular weight CP8 polysaccharides, whereas shorter heat treatment times at pH 3.5 result in the generation of higher molecular weight CP8 polysaccharides. The size of the CP8 polysaccharides ranged from about 80 kDa to about 220 kDa depending on the length of time of heat treatment at low pH (3.5). The correlation between the time of heat treatment at low pH and the size of the purified CP5 and CP8 polysaccharides, as shown in this study, allows for an estimation of the treatment time required to produce purified polysaccharide with a specified range of molecular weight.

[0230] It is important to note that as demonstrated above the full range of molecular weights of capsule polysaccharides for both CP5 and CP8 from 20 kDa

to more than 800 kDa can be produced, released and purified. The methods described may be used to produce specific ranges of desired high molecular weight capsule polysaccharides. A particularly advantageous range of high molecular weight capsule polysaccharide type 5 and type 8 can be generated from these methods having molecular weights ranging from 70 to 150 kDa. See Table 6. This range of molecular weights of capsule polysaccharide is useful in making immunogenic compositions by conjugating the polysaccharide to a carrier protein. Alternatively, this advantageous range of high molecular weight capsule polysaccharide ranges from 80 to 140 kDa of CP5 and CP8. See Table 6. Another advantageous range of high molecular weight capsule polysaccharide CP5 and CP8 is from 90 to 130 kDa, or from 90 to 120 kDa of CP5 and CP8. See Table 6. The conditions used to generate the CP5 capsule polysaccharide having a molecular weight range of from about 100 to 140 kDa are as follows: 95°C, pH 4.5 for 135 minutes. The conditions used to generate the CP8 capsule polysaccharide having a molecular weight range of from about 80 to 120 kDa are as follows: 95°C, pH 3.5 for 300 minutes.

Table 6: Production of Specific Range of High Molecular Weight CP5 and CP8

Run	CP8 MW (kDa)	CP5 MW (kDa)
1	98	142
2	89	108
3	108	142
4	108	108
5	89	ND
6	100	ND
7	99	63
8	113	72
9	105	74
10	100	63
11	87	ND

ND= not done

Example 4: Conjugation of Capsule Polysaccharides CP5 and CP8 to CRM_{197}

[0231] This example describes processes and characterization assays used in the production of *S. aureus* CP5- CRM_{197} and CP8- CRM_{197} conjugates. Several conjugation chemistries were evaluated for conjugating *S. aureus* capsule

polysaccharides CP5 and CP8 to a carrier protein. Conjugation using PDPH (3-2-pyridyldithio)-propionyl hydrazide) results in covalent thioether bond and CDI/CDT (1,1-carboyldiimidazole/1,1-carboyl-di-1,2,4-triazole) results in a one-carbon or zero-carbon linker between CP and carrier protein.

Conjugation of CP to CRM_{197} by PDPH Conjugation Chemistry

[0232] The PDPH conjugation chemistry is a multi-step process that involves activation of the polysaccharide, removal of the thiol protecting group, purification of the activated polysaccharide intermediate, activation and purification of the CRM_{197} protein, and conjugation of the activated components followed by purification. After introduction of a thiol group containing linker to the polysaccharide and a haloacetyl group to the CRM_{197} protein carrier, *S. aureus* CP5 and CP8 polysaccharides were linked to the protein carrier through a thioether bond. Bromoacetyl groups were introduced into the CRM_{197} protein by reaction of amine groups with the N-hydroxysuccinimide ester of bromoacetic acid. To generate thiolated CP, the carbodiimide activated carboxylate groups of N-acetylmannosaminouronic acid in CP were coupled to the hydrazide group of the sulfhydryl-reactive hydrazide heterobifunctional linker 3-(2-pyridyldithio)-propionyl hydrazide (PDPH). Thiols of PDPH-thiolated CP, generated by reduction with DTT and purified by SEC on a Sephadex G25 column, reacted with bromoacetyl groups of activated protein resulting in covalent thioether linkage formed by bromine displacement between CP and the protein. Non-reacted bromoacetyl groups were "capped" with cysteamine hydrochloride (2-aminoethanethiol hydrochloride). The reaction mixture was then concentrated and diafiltered. The remaining unconjugated bromoacetyl groups were capped with cysteamine hydrochloride to ensure no reactive bromoacetyl groups were left after conjugation. This formed a covalent bond between the thiol end of cysteamine and the acetyl group on the lysine residue after displacement of bromine.

Thiolation of *S. aureus* Capsular Polysaccharide with PDPH

[0233] The polysaccharide was first activated by thiolation with PDPH. The polysaccharide was mixed with a freshly prepared PDPH stock solution (250 mg/mL in DMSO), an EDAC stock solution (90 mg/mL in diH_2O), and MES

buffer stock solution (0.5M, pH 4.85) to make the final solution 0.1 M MES, and 2 and 4 mg CP/mL while maintaining a CP:PDPH:EDAC ratio by weight of 1:5:3 for CP 5 and 1:0.6:1.25 for CP 8. This mixture was incubated for 1 hour at room temperature and then dialyzed against a 1000X volume of distilled H_2O four times using a 3500 MWCO dialysis device at between 4° and 8°C to remove unreacted PDPH. The PDPH-linked polysaccharide was made 0.2 M DTT and incubated at room temperature for 3 hours or overnight at between 4 and 8°C. Excess DTT as well as the by-products of the reaction were separated from the activated saccharide by SEC using Sephadex G25 resin and distilled water as the mobile phase. Fractions were assayed by the DTDP assay for thiol groups and thiol-positive fractions that eluted near the void volume of the column were pooled. The pool of fractions was assayed by the PAHBAH and the O-acetyl assays to determine the degree of activation which is expressed as a molar percent of the repeat units containing a thiol group (molar concentration of thiols/molar concentration of repeat units). The activated polysaccharide was lyophilized and stored at -25°C until needed for conjugation.

Carrier protein activation

[0234] Separately, the carrier protein was activated by bromoacetylation. CRM_{197} was diluted to 5 mg/mL with 10 mM phosphate buffered 0.9% NaCl pH 7 (PBS) and then made 0.1 M $NaHCO_3$ pH 7.0 using 1 M stock solution. The N-hydroxysuccinimide ester of bromoacetic acid (BAANS) was added at a CRM_{197} :BAANS ratio 1:0.25 (w:w) using a BAANS stock solution of 20 mg/mL DMSO. This reaction mixture was incubated at between 4 and 8°C for 1 hour then purified using SEC on Sephadex G-25. The purified activated CRM_{197} was assayed by the Lowry assay to determine the protein concentration and then diluted with PBS to 5 mg/mL. Sucrose was added to 5% wt/vol as a cryoprotectant and the activated protein was frozen and stored at -25°C until needed for conjugation.

Coupling Reaction

[0235] Once the activated capsule polysaccharide and activated carrier protein were prepared, the two were combined in a conjugation reaction. The lyophilized and thiolated polysaccharide was dissolved in 0.16 M borate pH 8.95, mixed with

thawed bromoacetylated CRM_{197} and distilled water to make the final solution 0.1 M borate, 1:1 wt/wt ratio of CRM_{197}:CP, and 1 mg/mL polysaccharide for CP8 and 2 mg/mL polysaccharide for CP5. This mixture was incubated at room temperature for between 16 and 24 hours. Unreacted bromoacetyl groups on the protein were capped by adding cysteamine hydrochloride at a ratio of CRM_{197}:cysteamine of 1:2 (wt/wt) using a 135 mg/mL stock solution of cysteamine dissolved in 0.1 M borate pH 8.95 and incubated for 4 hours at room temperature. The capsule polysaccharide-CRM_{197} conjugate (conjugate) was purified by diafiltering 50-fold against 0.9% NaCl using a 100K polyethersulfone ultrafilter.

[0236] The results from the reproducibility of CP5 and CP8 thiolation studies with PDPH demonstrated that the degree of activation of CP5 was in the range 11 to 19 % which corresponds to approximately one linker molecule attached per ten CP repeat units to one linker molecule per five repeat units. The CP8 activation was in the range of 12 to 16%, which was very similar to activation of CP5.

[0237] Bromoacetylation of lysine residues of CRM_{197} was very consistent, resulting in the activation of 19 to 25 lysines from 39 lysines available. The reaction produced high yields of activated protein.

Conjugation of CP to CRM_{197} by CDI/CDT Conjugation Chemistry

[0238] CDI and CDT afford a one-step conjugation process where the polysaccharide is activated in an anhydrous environment (DMSO) to form imidazole or triazole carbamate moieties with available hydroxyls and acylimidazole or acyltriazole moieties with carboxylic acids. Addition of a protein carrier (in DMSO) leads to the nucleophilic displacement of the imidazole or triazole by lysine and formation of a carbamate linkage (for activated hydroxyls) and the amide linkage (for activated carboxylic acids). The reaction solution is diluted 10-fold into an aqueous solution to remove unreacted activation groups and then purified by diafiltration.

[0239] Both conjugation chemistries produced CP covalently linked to the carrier protein, which was indicated by the presence of the saccharide and protein in the fractions from size exclusion chromatography, and by amino acid analysis of glycolaldehyde capped or cysteamine hydrochloride capped conjugate.

[0240] Summary of the results from the preparation of several lots of conjugates prepared by both PDPH and CDI/CDT chemistries for both capsular serotypes with polysaccharide size in the range of 20 to 40 kDa are shown in Table 7 below. There were no significant differences in the free capsule polysaccharide, ratio of CP:Protein and yields of conjugates generated by these two conjugation methods. The antigenicity of conjugated CP was not altered by conjugation as portrayed by identity precipitin line between conjugates and native CP.

Table 7: Characterization of SA CP5-CRM_{197} and CP8-CRM_{197} Prepared by Two Conjugation Chemistries

Conjugate	Chemistry	CP Yield (%)	Protein Yield (%)	Output Ratio	Free saccharide (%)	Free Protein (%)	Lysines Modified	Size (Mw or Kd (% less than 0.3), sacc/prot))
SA CP5-CRM_{197}	CDT	19-27	35	0.5-0.8	10-40	<1	18-22	38/61 to 76/74
	PDPH	26-52	40-99	0.4-1.0	23-50	ND	ND	7.5×10^5 to 2.3×10^6
SA CP8-CRM_{197}	CDI	46-62	54-55	0.8-0.9	22-25	<1	7-8	34/57 to 60/57
	PDPH	34-70	61-83	0.6-0.9	15-41	ND	11-16	74 92%

[0241] As shown above, the methods described herein may be used to produce specific ranges of desired high molecular weight capsule polysaccharides. The aim of this study was to prepare conjugates from a pre-selected range of high molecular weights that could be filtered and purified CP for use in immunogenic compositions. In this example, eight batches where the CP5 capsule polysaccharide ranged in molecular weight from about 90 kDa to about 120 kDa were selected and conjugation was performed using activation with triazole (CDT). See Table 8. The molecular weights of the resulting conjugates ranged from 1533 kDa to 2656 kDa. The number of conjugated lysines per CRM_{197} ranged from a high of 22 to a low of 15. The free capsule polysaccharide ranged from a high of 18% to a low of 11 %. See Table 8.

Table 8 Conjugates With Preselected MW Range of CP5

Run	Poly MW (kDa)	Sacc Yield (%)	Free saccharide (%)	MW by SEC-MALLS (kDa)	Lysines Modified
1	121	63	11	2130	19
2	92	72	16	1533	22
3	119	74	14	2656	15
4	115	63	18	1911	15

[0242] Table 9 summarizes the analysis of CP8 conjugates where the CP8 capsule polysaccharide ranged in molecular weight from about 87 kDa to 113 kDa and the imidazole conjugation chemistry was utilized. The molecular weights of the resulting conjugates ranged from 595 kDa to 943 kDa. The number of conjugated lysines per CRM_{197} ranged from a high of 9 to a low of 3. The free capsule polysaccharide ranged from a high of 6% to a low of 2%. See Table 9.

Table 9 Conjugates With Preselected MW Range of CP8

Run	Poly MW (kDa)	Sacc Yield (%)	Free saccharide (%)	MW by SEC-MALLS (kDa)	Lysines Modified
1	99	88	6	943	4
2	113	73	5	841	3
3	105	79	3	719	7
4	100	86	2	630	9
5	87	90	3	595	6

[0243] Both conjugation chemistries produce CP covalently linked to carrier protein. There were no significant differences in free capsule polysaccharide, ratio of CP:Protein and yields of conjugates generated by these two methods.

Example 5: Sequence Diversity of Polypeptide Fragments N1, N2 and N3 of ClfA

[0244] In this example the protein sequence heterogeneity of ClfA polypeptide fragments N1, N2 and N3 from disease causing isolates obtained from various sources was evaluated. ClfA genes were sequenced from strains of *S. aureus* associated with multiple disease states. Sequence information from additional strains was obtained from GenBank to generate sequences from relevant strains. Table 10 lists different ClfA sequences.

[0245] The sequence alignment of ClfA proteins from different disease-causing strains of *S. aureus* is shown in Figure 8A-8E. The protein sequences were aligned using MUSCLE. See Edgar, R.C. Nucleic Acids Research 32 (5):1792-1797 (2004). The alignments were displayed using SHOWALIGN. See Rice, P. et al., "EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite" Trends in Genetics, 16 (6): 276-277 (2000). Many of the sequences recurred multiple times without variation. For clarity each unique sequence was placed in the alignment only once. See Figure 8A-8E. Only unique sequences were included in the sequence listing. For example, the protein sequence of ClfA_001 was obtained from multiple different strains without any variation. See Figure 8A-8E. The sequence listing number for any sequence can also be obtained from Table 10: ClfA strains and Sequence Listings. Table 10 lists one example strain that contained this same ClfA_001 protein sequence. This sequence is shown in the first row of the alignment in Figure 8A-8E. This alignment of unique sequences of the ClfA antigen indicates that polymorphisms were distributed throughout the entire A region (N1-N2-N3) of ClfA. In some cases, for any given unique protein sequence of ClfA, more than one nucleotide sequence, encoding the same protein, was discovered. Only the most frequently occurring DNA sequence was included in the sequence listing and in Table 10. For ClfA, the following sequences are disclosed herein and are not found in GenBank: ClfA_003, ClfA_005, ClfA_008, ClfA_009, ClfA_013, ClfA_014, ClfA_015, ClfA_016, ClfA_017, ClfA_018, ClfA_019, ClfA_020, ClfA_021, ClfA_022, ClfA_023, and ClfA_024.

Table 10: ClfA strains and Sequence Listings

Example Strain	DNA-ClfA	NT SEQ ID NO:	Protein-ClfA	AA SEQ ID NO:	% Identity to Antigen
PFESA0131	clfA_001-1	61	clfA_001	62	99
PFESA0074	clfA_002-1	63	clfA_002	64	92
PFESA0072	clfA_003-1	65	clfA_003	66	99
PFESA0159	clfA_004-1	67	clfA_004	68	94
PFESA0154	clfA_005-1	69	clfA_005	70	91
PFESA0096	clfA_006-1	71	clfA_006	72	91
PFESA0269	clfA_007-1	73	clfA_007	74	91
PFESA0081	clfA_008-1	75	clfA_008	76	97
PFESA0005	clfA_009-1	77	clfA_009	78	95
PFESA0139	clfA_010-1	79	clfA_010	80	99

Example Strain	DNA-ClfA	NT SEQ ID NO:	Protein-ClfA	AA SEQ ID NO:	% Identity to Antigen
PFESA0237	clfA_011-1	81	clfA_011	82	100
PFESA0157	clfA_012-1	83	clfA_012	84	96
PFESA0069	clfA_013-1	85	clfA_013	86	92
PFESA0002	clfA_014-1	87	clfA_014	88	98
PFESA0147	clfA_015-1	89	clfA_015	90	91
PFESA0094	clfA_016-1	91	clfA_016	92	98
PFESA0143	clfA_017-1	93	clfA_017	94	97
PFESA0129	clfA_018-1	95	clfA_018	96	99
PFESA0128	clfA_019-1	97	clfA_019	98	92
PFESA0148	clfA_020-1	99	clfA_020	100	91
PFESA0140	clfA_021-1	101	clfA_021	102	98
PFESA0152	clfA_022-1	103	clfA_022	104	91
PFESA0141	clfA_023-1	105	clfA_023	106	96
PFESA0160	clfA_024-1	107	clfA_024	108	94

[0246] The phylogeny of the ClfA protein sequences was examined and a phylogenetic tree was constructed. Sequences were aligned using ClustalW. See Chenna R, Sugawara H, Koike T, et al. Nucleic Acids Research. 31(13):3497-3500 (2003). Neighbor-joining trees were bootstrapped 1000 times and were displayed with MEGA 4.0. See Tamura K, et al., Molecular Biology & Evolution. 24(8):1596-1599 (2007). Bootstrap values, indicated on the branches, are the number of times that branch was reproduced in 1,000 trials. Values less than 500 (50% reproducibility) are considered to be poorly supported.

[0247] The ClfA sequences form a tree with 2 major branches. See Figure 9. The separation of these two groups is very well supported in the phylogeny. One branch (top) includes 9 sequences that are fairly closely related to one another (96-99% identity) but more distantly related to the candidate sequence clfA_011, to which they are 91-92% identical. The second group, which includes clfA_011, is more diverse and the phylogeny in this group is not as well supported. These protein sequences range from 93-99% identical to one another.

Example 6: Sequence Diversity of Polypeptide Fragments N1, N2 and N3 of ClfB

[0248] In this example, the protein sequence heterogeneity of ClfB N1, N2 and N3 polypeptide fragments from 92 disease-causing isolates obtained from various sources was evaluated. ClfB genes were sequenced from strains of *S. aureus*

associated with multiple disease states. See Table 11. Information from additional strains was obtained from GenBank to generate additional sequences.

[0249] The sequence alignment of ClfB proteins from different disease-causing strains of *S. aureus* is shown in Figure 10A-10E. The protein sequences were aligned using MUSCLE. See Edgar, R.C. Nucleic Acids Research 32 (5):1792-1797 (2004). The alignments were displayed using SHOWALIGN. See Rice, P. et al., "EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite" Trends in Genetics, 16 (6): 276-277 (2000). See Figure 10A-10E ClfB align. As with ClfA, many of the sequences recurred multiple times without variation. For clarity, each unique sequence was placed in the alignment only once. See Figure 10A-10E. Only unique ClfB sequences were included in the sequence listing. For example, the sequence of ClfB_006 was obtained from multiple different strains without any variation. This sequence is shown in the first row of the alignment in Figure 10A-10E. The sequence listing number for any sequence can also be obtained from Table 11. This alignment of representative unique sequences of the ClfB antigen indicates that polymorphisms were distributed throughout the entire A region (N1-N2-N3) of ClfB. Similar to ClfA, for any given unique protein sequence of ClfB, more than one nucleotide sequence encoding the same protein was discovered. Only the most frequently occurring DNA sequence was included in the sequence listing and in Table 11. For ClfB, the following sequences are disclosed herein and are not found in GenBank: ClfB_001, ClfB_004, ClfB_005, ClfB_010, ClfB_011, ClfB_013, ClfB_014, ClfB_015, ClfB_016, ClfB_017, ClfB_018, ClfB_019, ClfB_020, ClfB_021, ClfB_022, ClfB_023, and ClfB_024. The phylogenetic tree is shown in Figure 11.

Table 11: ClfB Strains and Sequence Listings

Example Strain	DNA-ClfB	SEQ ID NO:	Protein-ClfB	SEQ ID NO:	% Identity to Antigen
PFESA0286	clfB_001-1	15	clfB_001	16	95
PFESA0159	clfB_002-1	17	clfB_002	18	95
RF122	clfB_003-1	19	clfB_003	20	94
PFESA0271	clfB_004-1	21	clfB_004	22	95
PFESA0081	clfB_005-1	23	clfB_005	24	95
PFESA0080	clfB_006-1	25	clfB_006	26	100
PFESA0270	clfB_007-1	27	clfB_007	28	99

Example Strain	DNA-ClfB	SEQ ID NO:	Protein-ClfB	SEQ ID NO:	% Identity to Antigen
PFESA0269	clfB_008-1	29	clfB_008	30	95
PFESA0145	clfB_009-1	31	clfB_009	32	94
PFESA0069	clfB_010-1	33	clfB_010	34	95
PFESA0002	clfB_011-1	35	clfB_011	36	96
PFESA0128	clfB_013-1	37	clfB_013	38	96
PFESA0129	clfB_014-1	39	clfB_014	40	95
PFESA0136	clfB_015-1	41	clfB_015	42	99
PFESA0139	clfB_016-1	43	clfB_016	44	99
PFESA0140	clfB_017-1	45	clfB_017	46	96
PFESA0141	clfB_018-1	47	clfB_018	48	94
PFESA0144	clfB_019-1	49	clfB_019	50	97
PFESA0150	clfB_020-1	51	clfB_020	52	96
PFESA0152	clfB_021-1	53	clfB_021	54	96
PFESA0156	clfB_022-1	55	clfB_022	56	96
PFESA0163	clfB_023-1	57	clfB_023	58	94
PFESA0211	clfB_024-1	59	clfB_024	60	99

Example 7: Sequence Diversity Of MntC In Disease-Causing Clones of *S. aureus*

[0250] In this example, the protein sequence heterogeneity of MntC genes from 104 disease-causing isolates obtained from various sources was evaluated. MntC genes were sequenced from strains of *S. aureus* associated with multiple disease states. See Table 12. Information from additional strains was obtained from GenBank to generate strain sequences.

[0251] The sequence alignment of MntC proteins from different disease-causing strains of *S. aureus* is shown in Figure 12A-12B. The protein sequences were aligned using MUSCLE. See Edgar, R.C. Nucleic Acids Research 32 (5):1792-1797 (2004). The alignments were displayed using SHOWALIGN. See Rice, P. et al., "EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite" Trends in Genetics, 16 (6): 276-277 (2000). See Figure 12. As with ClfA, many of the sequences recurred multiple times without variation. For clarity, each unique sequence was placed in the alignment only once. See Figure 12. Only unique MntC sequences were included in the sequence listing. For example, the sequence of MntC_001 was obtained from different strains without any variation. See Figure 12. This sequence is shown in the first row of the alignment in Figure 12. The sequence listing number for any sequence can also be obtained from Table 12.

Only the most frequent corresponding DNA sequence was included in the sequence listing. For MntC, the following sequences are disclosed herein and are not found in GenBank: MntC_002, MntC_006, MntC_007, MntC_008, and MntC_009.

Table 12: MntC strains and Sequence Listings

Strain	DNA-MntC	SEQ ID NO:	Protein-MntC	SEQ ID NO:	% Identity to Antigen
PFESA0129	MntC_001-1	1	MntC_001	2	99
PFESA0142	MntC_002-1	3	MntC_002	4	99
PFESA0139	MntC_003-1	5	MntC_003	6	99
PFESA0286	MntC_006-1	7	MntC_006	8	99
PFESA0136	MntC_007-1	9	MntC_007	10	99
PFESA0150	MntC_008-1	11	MntC_008	12	99
PFESA0153	MntC_009-1	13	MntC_009	14	99

Example 8: Surface Expression of ClfA, CP5, CP8 And MntC *In vivo* During Infection

[0252] *S. aureus* is responsible for causing a diverse array of human infections. Consequently the bacteria must adapt to different environmental niches by differential expression of virulence factors required for infection. The expression of target antigens was studied in three *in vivo* rodent assays to assess their expression during infection: a wound model to measure expression of the antigen at the primary site of infection, a bacteremia model that monitors antigen expression in the blood, and an indwelling chamber model that monitors antigen expression during nutrient/oxygen limited conditions. For all these models the rodents were challenged with bacteria at the site of study. Following infection, bacteria were harvested at various time-points and antigen expression (ClfA, CP5, CP8, MntC) was assessed using immunofluorescent microscopy (wound and bacteremia) or flow cytometry (chamber).

MATERIALS AND METHODS

Expression in the Wound Model

[0253] Wound infection experiments consist of 5 animals/group and up to 5 groups for a maximum of 25 animals/experiment. Six to eight week (wk) old C57BL/6 male mice underwent surgery to embed a loop of suture into a thigh

muscle incision. This provides a foreign-body substrate for bacterial attachment and significantly reduces the minimum infectious dose needed to produce a staphylococcal wound infection. Five µL of either *S. aureus* or sterile saline were introduced into the incision under the deep tissue suture of 4-0 silk. The skin was closed with 4-0 Prolene sutures or surgical adhesive (*e.g.*, cyanoacrylate). The animals were euthanized at time points between 30 min and 10 days following infection and the thigh muscle excised, homogenized and the bacteria enumerated. Bacteria at the sight of infection were analyzed for antigen expression by immunofluorescent (IF) confocal microscopy.

Expression in the Bacteremia Model

[0254] Groups of 10 four-wk old CD-1 or Balb/C mice were immunized with 1 µg of protein or CP conjugate by subcutaneous injection on wks 0, 3 and 6. The animals were bled on wks 0 and 8 followed by an intraperitoneal challenge with *S. aureus* grown to late log phase in TSB. Three hours following challenge the animals were euthanized and blood collected for IF confocal microscopy.

Expression in the Indwelling Dialysis Tubing Model

[0255] *S. aureus* isolates were grown overnight on TSA plates at 37°C. Bacteria were scraped from the plates and resuspended in sterile PBS and the OD_{600} adjusted to 1, approximately 10^9 colony forming units (cfu) /mL. Bacteria were diluted to a concentration of 10^3 cfu/mL and inoculated into dialysis tubing. An aliquot of the suspension was plated to determine the actual number of cfu. Dialysis tubing with 3.5 kDa MWCO was prepared for implant by sterilizing in 70% ethanol for 30 minutes followed by extensive rinsing in sterile water and then sterile saline. A 2 mL aliquot of the bacterial suspension was transferred to the dialysis tubing, the bag closed with a knot, and then rinsed extensively with sterile saline. Male Sprague Dawley rats (6 weeks old) were anaesthetized and a 2-3 cm incision made along the dorsal midline. Pockets were created at the site of incision by gently separating the skin from the underlying tissue. Tubing was implanted in the pockets and skin was closed using surgical staples. After 24 h, rats were euthanized, the tubing removed, and the bacteria recovered for flow cytometric analysis.

Immunofluorescent Microscopy (IF)

[0256] The blood from 5 mice was pooled into ice-cold sodium citrate, pH 7.0 (final concentration, 0.4%). The eukaryotic cells were lysed with 1% NP-40 (Pierce Biotechnology). The bacteria were washed with PBS and incubated overnight at 4°C with rabbit immune or preimmune serum (1:100) and detected with ALEXA488 conjugated goat-α-rabbit antibody (1:250, Invitrogen). The labeled bacteria were dried on a microscope slide and a coverslip was mounted with Vectashield HardSet medium (Vector Laboratories, Inc.). Images were obtained with a Leica TCS SL spectral confocal microscope (Leica Microsystems).

Flow Cytometric Analysis

[0257] *S. aureus* isolates were grown as described in the rat dialysis tubing model procedure. Approximately 10^7 bacterial cells were blocked in staining buffer (Hank's balanced salt solution with 10% goat sera) for 1 hour on ice. Bacterial cells were centrifuged for 5 minutes at 10,000 rpm, supernatant removed, and cells incubated with mouse antibody or isotype control antibody for 30 minutes on ice. Cells were then washed and stained with FITC conjugated goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch) on ice for 30 minutes. Bacteria were washed with staining buffer, fixed with 2% paraformaldehyde and data acquired and analyzed using FACS Caliber flow cytometer and Cell quest software (Becton, Dickinson and Co.). A total of 30,000 events were collected for each sample.

Table 13a: Antigen Expression Profiles in *S. aureus* CP Type 5 Isolates.

Antigen		CP						ClfA						MatC					
Time [h]		T_0	1	4	6	24	72	T_0	1	4	6	24	72	T_0	1	4	6	24	72
PFESA0266	bacteremia	+	-	±	+	/	/	+	-	±	+	/	/	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	wound	+	-	-	-	±	+	+	-	±	+	+	+	-	±	±	±	±	±
PFESA0272	bacteremia	+	+	+	+	/	/	+	-	+	+	/	/	-	-	-	-	/	/
	wound	+	-	-	-	+	!	+	-	±	±	±	!	-	-	-	±	!	!
PFESA0094	bacteremia	+	-	±	+	/	/	+	-	±	!	/	/	-	-	-	-	/	/
	wound	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	±	±	±
PFESA0093	bacteremia	+	-	±	+	/	/	+	-	±	+	/	/	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	wound	+	-	-	±	+	+	+	-	-	-	±	±	-	-	-	±	±	±

PFESA0028	bacteremia		-	-	-	/	/	+	-	±	+	/	/	-	-	±	±	/	/
	wound	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	±	±	-
PFESA0029	bacteremia	-	-	±	+	/	/	+	-	-	+	/	/	-	-	-	+	/	/
	wound	-	-	-	-	±	±	+	-	-	-	-	±	-	-	-	±	±	-

/= bacteremia experiments were conducted for 6 hours != animal died during experiment NT= not tested

Table 13b: Antigen Expression Profiles in *S. aureus* CP Type 8 Isolates.

Antigen		CP						ClfA						MntC					
Time (h)		T0	1	4	6	24	72	T0	1	4	6	24	72	T0	1	4	6	24	72
PFESA0003	Bacteremia	+	±	+	-	/	/	+	-	±	+	/	/	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	Wound	-	-	+	+	+	+	+	-	±	+	+	!	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PFESA0286	Bacteremia	+	-	-	+	/	/	+	-	-	+	/	/	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	Wound	-	-	-	+	!	!	+	-	+	-	!	!	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PFESA0005	Bacteremia	+	-	+	±	/	/	+	+	-	+	/	/	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	Wound	NT	NT			!	!	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PFESA0002	Bacteremia	+	-	-	-	/	/	+	+	-	-	/	/	-	+	±	-	/	/
	Wound	+	-	-	-	+	!	-	-	-	-	±	NT	-	-	±	±	+	-
PFESA0269	Bacteremia	+	-	-	-	/	/	+	-	-	-	/	/	-	-	±	±	/	/
	Wound	+	-	-	±	+	+	+	-	-	+	±	NT	-	-	-	-	+	±
PFESA0268	Bacteremia	+	+	+	-	/	/	+	+	-	-	/	/	-	+	-	-	/	/
	Wound	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	±	NT	-	-	-	±	+	-
PFESA0025	Bacteremia	-	-	-	-	/	/	+	-	-	-	/	/	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	Wound	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	NT	-	-	-	-	+	+
PFESA0283	Bacteremia	+	-	-	-	/	/	+	+	+	-	/	/	+	+	±	±	/	/
	Wound	+	-	-	-	!	!	+	-	-	+	!	NT	-	-	-	±	+	±
PFESA0027	Bacteremia	-	-	-	±	/	/	+	-	±	+	/	/	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	Wound	+	-	+	±	+	+	+	-	-	+	+	NT	-	-	-	-	+	+
PFESA0001	Bacteremia	+	-	-	-	/	/	+	-	-	-	/	/	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	Wound	-	-	-	±	+	+	+	-	-	-	±	NT	-	-	-	-	-	+
PFESA0095	Bacteremia	+	-	-	+	/	/	+	-	-	+	/	/	NT	NT	NT	NT	NT	NT
		+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	±	NT	-	-	-	-	+	
PFESA0271	Bacteremia	+	-	-	-	/	/	+	+	-	-	/	/	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	Wound	-	-	-	-	+	-		-	-	+	+	NT	-	-	+	±	+	-
PFESA0271	Bacteremia	+	-	+	+	/	/	+	-	+	+	/	/	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	Wound	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	NT	-	-	-	-	+	±

/= bacteremia experiments were conducted for 6 hours. != animal died during experiment NT= not tested

Table 13c. Expression of *S. aureus* antigens in the Indwelling Dialysis Tubing.

Frequency of positive cells (% of total)

***S. aureus* PFESA0266**	**Time (hrs)**	**0**	**3**	**6.0**	**9.0**	**13.0**	**18.0**	**30.0**
	ClfA	69.8	13.7	8.5	8.0	12.5	8.8	16.4
	CP5	28.0	1.9	1.8	6.1	7.1	5.2	9.6
	MntC	91.4	4.3	5.6	2.9	20.8	37.0	33.2
***S. aureus* PFESA0005**	**Time (hrs)**	**0**	**3**	**6.0**	**9.0**	**13.0**	**18.0**	**24.0**
	ClfA	98.6	63.9	69.7	24.3	36.1	98.6	99.0
	CP8	77.3	43.0	18.0	7.5	11.8	96.4	94.0
	MntC	5.9	7.7	12.5	2.6	2.9	9.3	9.9

Results

[0258] A combination of nineteen *S. aureus* isolates were tested for expression of ClfA, CP5, CP8, or MntC on the *S. aureus* cell surface during infection (Table 13a, 13b, and 13c). These isolates included recent clinically relevant strains and were diverse as monitored by MLST. Antigen expression was dependent on the strain, time point, and the infection model. The variation in antigen expression between isolates in different *in vivo* environments (bloodstream vs. wound) supports the use of a multi-antigen immunogenic composition to induce broad coverage of staphylococcal isolates in a variety of different infections. The antigens were surface expressed within the first 24 hours of infection and are thus valid components for an anti-staphylococcal immunogenic composition. Protein antigens ClfA and MntC were accessible to staining in the presence of capsule expression indicating that the presence of capsule does not mask the proteins from antibodies directed against them.

[0259] Most of the tested type 8 isolates did not express CP in the blood until later time points post-challenge (> 4 hour) (See Table 13a-c). These results demonstrate that in *S. aureus* CP is differentially regulated depending on the *in vivo* microenvironment, i.e., site of infection. These results may explain the inconsistent efficacy results reported for CP8 conjugates in animal models.

[0260] *In vivo* expression results suggest that no single antigen immunogenic formulation will provide broad coverage against the majority of *S. aureus* infections. There is too much diversity of expression phenotypes by individual strains within *in vivo* microenvironments. Therefore, an immunogenic

composition consisting of more than one antigen is required to prevent *S. aureus* disease.

Example 9: Immunogenicity of Multi-Antigen Formulations Containing ClfA, CP5- and CP8-CRM_{197} Conjugates

[0261] In this example, we evaluated the immunogenicity of combinations of ClfA, CP5-CRM_{197} and CP8-CRM_{197}.

A. Bi-antigen (CP5-CRM_{197}/CP8-CRM_{197}) immunogenic composition formulation – dose effect on the anti-capsular antibody responses in rabbit

[0262] In this example, the dose effect on the immunogenicity of the combined CP5-CRM_{197} and CP8-CRM_{197} immunogenic formulation in rabbits was evaluated. Rabbits were immunized on week 0, 3 and 6 with bivalent conjugate plus 125 µg $AlPO_4$ administered by subcutaneous injection. The doses evaluated in this study were 0.1 µg, 1 µg, or 10 µg each of CP5-CRM_{197} and CP8-CRM_{197} (final combined CP- CRM_{197} doses of 0.2 µg, 2 µg, and 20 µg). The dose of the conjugate reflects the total polysaccharide component of the protein polysaccharide conjugate. Rabbits were bled on week 0, 3, 6 and 8. ELISA was performed on pooled and individual sera. Endpoint antibody titers were determined as the reciprocal dilution at 0.1 OD_{405}. Statistical analysis was performed on individual week 8 titers. The results demonstrated that the highest CP5 and CP8 specific antibody titers of 5×10^5 for CP5 and 1×10^6 for CP8 were induced by vaccination of rabbits with bivalent immunogenic formulation at 1 µg CP dose of each component (Data not shown.).

B. Tri-antigen formulation (CP5-CRM_{197} + CP8-CRM_{197} + rClfA) - rClfA dose range study with fixed dose (1 µg) of each conjugate in rabbits

[0263] The effect of a combination of rClfA and CP5 and CP8 conjugates on immune response to each component was tested. Three groups were immunized with bivalent *S. aureus* CP5-CRM_{197} + CP8-CRM_{197} (1µg dose of each conjugate) combined with T7-ClfA (N1N2N3) at three different doses 1, 10 and 100 µg. The control group was immunized with unconjugated CP5 and CP8 (50 µg each) combined with 100 µg of T7-ClfA (N1N2N3). Each immunogenic composition was formulated with 500 µg of adjuvant $AlPO_4$. Immunogenic compositions were

administered by subcutaneous injection in the neck. Rabbits were bled on week 0, 6 and 8. ELISA was performed on pooled and individual sera and endpoint antibody titers were determined as the reciprocal dilution at 0.1 OD_{405}.

[0264] Results showed that increased amount of rClfA when combined with bivalent conjugate did not affect capsular antibody responses. The antibody levels to both capsular serotypes were in the same range as in rabbits immunized with bivalent conjugate only (Data not shown). The antibody levels to CP5 and CP8 were 2.5 fold lower at 10 (103 K) and 100 µg (106 K) dose compared to 1 µg dose of rClfA (273 K). There was a booster effect after the second and third injection. Unconjugated bivalent polysaccharide immunogenic formulation (CP5 + CP8, 50 µg each) combined with 100 µg of rClfA did not induce CP specific antibodies. The rClfA specific antibody response was also not greatly affected by the dose, where titers were between 1 X 10^5 and 1 X 10^6 after three doses for 1, 10 and 100 µg doses (Data not shown.). Also the levels of anti-ClfA response achieved when administered with conjugated or unconjugated CP5 and CP8 polysaccharides were similar.

Example 10: Tri-Antigen Formulation - Immunogenicity In Rabbits With High Pre-Immunization CP5, CP8 and ClfA Ab Titers.

[0265] The staphylococcal immunogenic composition is targeted for adult populations that have pre-existing antibodies to *S. aureus* surface components. To study the effect of pre-existing antibodies to immunogenic formulation components on the response to the immunogenic formulation, we selected rabbits with high titers of naturally acquired anti-CP5, anti-CP8, and anti–ClfA antibody titers. Two groups of rabbits (n=6/7) were immunized on week 0, 3 and 6 with tri-antigen immunogenic formulation (CP5-CRM_{197} (1 µg) and CP8-CRM_{197} (1 µg) and T7-ClfA (N1N2N3)Y338A (10µg)). One group was immunized with the immunogenic composition formulated with 500 µg $AlPO_4$ as adjuvant and the second group was immunized with immunogenic composition formulation containing no adjuvant. Immunogenic compositions were administered by subcutaneous injection. Rabbits were bled on wk. 0, 3, 6 and 8. Antibody titers to CP5, CP8 and rClfA were determined by ELISA as endpoint antibody titers on pooled and individual sera (determined as the reciprocal dilution at 0.1 OD_{405}).

[0266] Results showed that rabbits with pre-existing antibody titers induced by natural infection responded to trivalent immunogenic formulation with an increase in levels of antibodies to all immunogenic formulation components CP5, CP8 and rClfA. An increase of Ab levels to each antigen of between 5 fold to 10 fold was shown even in animals with antibody titers of $1x10^6$. Presence of the adjuvant in the immunogenic formulation resulted in higher antibody titers compared to the group immunized without adjuvant (Data not shown).

Example 11: Effect Of The Adjuvant On Responses To Capsule Polysaccharide Components

A. Effect of Two Different Doses of $AlPO_4$ on Response to Bivalent CP5-CRM_{197}/CP8-CRM_{197} Conjugate Immunogenic Composition in Rabbits

[0267] The dose effect of the adjuvant $AlPO_4$ on the anti CP5 and CP8 responses in rabbits was studied. Rabbits were immunized on week 0, 3 and 6 with bivalent *S. aureus* CP5-CRM_{197} + CP8-CRM_{197} (1 µg dose of each conjugate). One group (n=5/group) was immunized with immunogenic composition formulated with 125 µg and a 2nd group with 500 µg of $AlPO_4$ as adjuvant. Immunogenic compositions were administered by subcutaneous injection in neck. Rabbits were bled on week 0, 6 and 8 and anti-capsular antibodies were determined by ELISA as endpoint antibody titers determined as the reciprocal dilution at 0.1 OD_{405}. Results indicated that there was no difference in CP8 specific antibody responses in rabbits immunized with either 125 µg or 500 µg of $AlPO_4$. The formulation with 125 µg of adjuvant gave higher CP5 antibody responses. Also, all rabbits in the 125 µg group responded with higher CP5 antibody responses, while in the 500 µg adjuvant group, there were two rabbits with low response to the formulation.

B. Effect of $AlPO_4$ on The Immunogenicity of Tri-Antigen Formulation

[0268] Rabbits (NZW, n=6/7 rabbits per group) were immunized on week 0, 3 and 6 with Tri-antigen formulation comprised of CP5-CRM_{197} (1 µg) and CP8-CRM_{197} (1µg) and T7-ClfA (N1N2N3)Y338A (10 µg). One group of rabbits was immunized with immunogenic formulation with 500 µg $AlPO_4$, a second group was formulated with no adjuvant, the third group was immunized at week 0 with

immunogenic formulation with 500 μg $AlPO_4$ and weeks 3 and 6 with immunogenic formulation with no adjuvant. Immunogenic formulations were administered by subcutaneous injection, rabbits were bled on week 0, 3, 6 and 8 and sera evaluated by antigen specific ELISA. Results showed that the presence of adjuvant in the immunogenic formulation did not have an effect on anti-CP5 or anti-CP8 responses in rabbits (Data not shown.). The GMT titers of Abs to both capsules were comparable. However, there was an adjuvant effect on ClfA specific antibody response shown in groups immunized with adjuvant present in all three vaccinations. The second and third boost with immunogenic formulation not containing $AlPO_4$ in the rabbits primed with the immunogenic formulation containing adjuvant gave higher ClfA responses compared to group with no adjuvant.

Examples 12-29: Preclinical Evaluation of *S. Aureus* ClfA, MntC, CP5-CRM_{197} and CP8-CRM_{197}:

[0269] Described below in Examples 12 through 29 are the results of the preclinical evaluation of the CP5 and CP8 conjugates, ClfA and MntC. The examples demonstrate the efficacy of these antigens in preclinical animal models. The examples also demonstrate that antibodies generated by the CP conjugates, ClfA and MntC have functional activity in *in vitro* assays.

[0270] Two different chemistries were used to conjugate CP to CRM_{197}, but no difference was observed in efficacy for the conjugates prepared by the different methods. O-acetylation of the capsular polysaccharides was shown to impact eliciting functional antibodies. Evaluation of a combined immunogenic composition comprising CP5-CRM_{197}, CP8-CRM_{197} and ClfA showed no interference on specific antibody (Ab) levels to each immunogenic formulation component.

Materials and Methods

ELISA

[0271] Maxisorp microtiter ELISA plates (Nalge Nunc International, Rochester, NY) were coated 18 hours at 4°C or for 90 min at 37°C with 1 μg/mL of ClfA antigen in PBS pH 7.5. The plates were washed five times in PBST (1X PBS,

0.1% polysorbate 20) and blocked with 1% (w/v) non-fat milk in PBS, with 0.05% polysorbate 20 for 1 h at room temperature. Plates were washed with PBST, and serially diluted (3-fold) and individual week 0, 3, 6 and 8 rabbit anti-sera were added to the plates and incubated either overnight at 4°C or 2 h at 37°C. The plates were washed, and bound primary antibodies were detected with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:1000 dilution) in PBST. The plates were incubated for 1 h at 37°C then washed and developed with ABTS-peroxidase substrate solution, (KPL, Inc., Gaithersburg, MD), at room temperature for approximately 20 minutes. The reaction was stopped by the addition of a 1% (v/v) SDS solution. Absorbance was measured at 405 nm in an automated plate reader (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA). Antibody titers were expressed as the reciprocal of the highest serum dilution with an absorbance value of 0.1. Student's t-test using JMP Software (SAS Institute, Cary, NC) was used to determine differences in antibody titers between the different groups. A probability of less than 0.05 was considered to indicate a statistically significant difference.

Murine Sepsis Models

[0272] The murine sepsis model mimics blood borne disease. For passive immunization, groups of 15 Swiss-Webster mice were treated intraperitoneally (i.p.) with IgG. Twenty four hours later mice were challenged with *S. aureus* 659-018 via by a single intravenous (i.v.) injection (0.1 ml) via the tail vein. All animals were followed for 14 to 15 days, at which point all remaining mice were sacrificed.

[0273] For active immunization, mice were immunized with antigen at 0, 2 and 4 weeks and challenged at week 6 by the intravenous route with *S. aureus*.

Active Immunization Rabbit Endocarditis model

[0274] Adult New Zealand White rabbits were immunized intramuscularly 4 times with 25 µg antigen. One day post-surgery, animals are challenged i.v. with a bolus of *S. aureus* and the number of colony forming units (cfu) in the heart tissue are determined 24 hours post-challenge.

Murine bacteremia

[0275] A 3 hr bacteremia model was used to determine the effect of vaccination on bacterial numbers early during an infection. Mice were immunized at weeks 0, 3, and 6 with antigen followed by i.p. challenge with *S. aureus* on week 8. Animals were exsanguinated 3 hours later and serial dilutions of blood plated to enumerate the bacteria.

Murine pyelonephritis model

[0276] The murine pyelonephritis model mimics the dissemination of *S. aureus* from bacteremia. Groups of 10 four week-old female CD-1 mice were immunized at 0, 3 and 6 weeks with antigen. The mice were challenged by i.p.. injection of *S. aureus*. Forty-eight hours following challenge the mice were sacrificed and the bacteria were enumerated in the kidney and blood.

Rat endocarditis model

[0277] The rat endocarditis model mimics human endocarditis in which colonization occurs after a blood borne infection leads to colonization of damaged heart tissue. Five 5 week-old male Sprague-Dawley rats (Charles River, Kingston, NY) were immunized on wks 0, 2 and 4 with 1 µg of CP5- CRM_{197} conjugate formulated with 100 µg of $AlPO_4$. The animals were bled prior to vaccination on wk 0 and at the end of wk 5. Seventy-two hours later, a catheter (PE-10 tubing) was surgically placed through the carotid artery into the left ventricle of the heart. Placement of the catheter results in the formation of a sterile vegetation to which the staphylococci can attach upon infection. To prevent infection resulting from the surgical procedure, the animals were treated with the antibiotic Baytril (5mg/kg) at the time of surgery and 8 hr following surgery. Forty-eight hours after surgery, the rats were challenged with PFESA0266 (approximately 4×10^8 cfu) or SA315 (approximately 1×10^9 cfu) by intraperitoneal injection. Forty-eight hours following challenge the rats were euthanized and the hearts and kidneys removed and placed into 3mL of phosphate buffered saline (PBS). The organs were then homogenized with a tissue homogenizer (Kinematica AG, Luzernerstrasse,

Germany) and brought to 10mL with PBS. The homogenates were then serially diluted and plated for bacterial enumeration.

Monitoring functional antibodies using opsonophagocytic killing assays

[0278] Differentiated effector cells from a cell line (e.g. HL60s) or polymorphonuclear cells (PMNs) isolated from donor human blood using LYMPHOLYTE®-poly solution (Cedarlane laboratories limited, Ontario, Canada) as per manufacturer's protocol can be used for this assay. Effector cells were resuspended in assay buffer (Modified Eagle's media containing 1% bovine serum albumin) at approximately 2 X 10^7 cells/ml concentration and placed in 37° C incubator until ready to use. *S. aureus* strain PFESA0266 was grown overnight on tryptic soy agar plates. Bacterial cells were scraped, washed twice and resuspended in assay buffer containing 5% glycerol to an OD_{600} = 1, which equals to approximately 5 X 10^8 cfu/ml concentration. One ml aliquots of the bacterial suspension were frozen and stored at -40°C until ready to use. Frozen bacterial suspension were thawed and adjusted to a concentration of 10^6 cfu/ml in assay buffer and placed on ice. The assay was performed using a sterile 96 deep well 1 ml polypropylene plates. Two fold serial dilutions of antibody samples (50 µl) were prepared and followed by addition of 300 µl of assay buffer to the antibody mix. Bacteria were added (50 µl) to the plates and placed on a rotary shaker at 4 °C for 30 minutes. The opsonization step was followed by addition of 50 µl of human complement (1% final concentration). Finally, 50 µl of effector cells (10^7 cells/ml concentration) were added to the plate and the suspension mixed well by repeated pipetting. A 50µl aliquot of the suspension was 10 fold serially diluted in sterile 1% saponin solution, vortexed to minimize bacterial clumping and plated on tryptic soy agar in duplicate. The assay plate was incubated at 37°C for 1 hour with continuous mixing using rotisseric style shaker. At the end of the incubation a 50µl aliquot of suspension was 10 fold serially diluted in sterile 1% saponin solution, mixed by vortexing to minimize bacterial clumping and plated on tryptic soy agar in duplicate. The percentage killing was calculated by determining the ratio of the number of cfu surviving at 60 minutes in wells with bacteria, antibodies, complement and effector cells to the number of cfu surviving in tubes

lacking antibodies but containing bacteria, complement and effector cells. Controls containing bacteria, complement, and sera were included to adjust for any reduction in cfu due to clumping.

Complement adsorption

[0279] Serum from human donors adsorbed against *S. aureus* strains PFESA0266, PFESA0286 and PFESA0270 can be used as a source of complement in the assay. *S. aureus* strains were grown overnight on TSA plates at 37°C. Cells were scraped from the plate and resuspended in sterile PBS. Bacterial cells were centrifuged at 10,000 rpm for 10 minutes at 4°C and cell pellet was resuspended in human serum for adsorption. Serum was incubated with bacteria on a nutator at 4°C for 30 minutes. Cells were centrifuged, serum transferred to another tube containing bacteria and the adsorption step repeated again for 30 minutes. Finally, the cells were centrifuged and the serum passed through a 0.2 micron filter before 0.5 ml aliquots were frozen down in liquid nitrogen.

Method II - OPA using HL-60 cells

[0280] HL-60 cells were differentiated according to S. Romero-Steiner, et al., Clin Diagn Lab Immunol 4 (4) (1997), pp. 415-422. Harvested HL-60 cells were resuspended in assay buffer (Modified Eagle's media containing 1% bovine serum albumin) at approximately 10^8 cells/ml and placed in 37 °C incubator until ready to use. *S. aureus* was grown overnight on tryptic soy agar plates. Bacterial cells were scraped, washed twice and resuspended in assay buffer containing 5% glycerol to an $OD_{600} = 1$, which equals to approximately 5 X 10^8cfu/ml. One ml aliquots of the bacterial suspension were frozen and stored at -40°C until ready to use. Frozen bacterial suspension were thawed and adjusted to a concentration of 10^6 cfu/ml in assay buffer and placed on ice. The assay was performed using a sterile 96 deep well 1 ml polypropylene plates. Two fold serial dilutions of monoclonal antibody samples (25µl) were prepared and followed by addition of 150 µl of assay buffer to the antibody suspension. Bacteria were added (25µl) to the plates and placed on a rotary shaker at 4 °C for 30 minutes followed by addition of 25 µl of human complement (1% final concentration). Finally, 25µl of

HL-60 cells (10^7 cells/ml) were added to the plate and the suspension mixed well by repeated pipetting. A 25µl aliquot of the suspension was 10 fold serially diluted in sterile 1% saponin solution, mixed by vortexing to minimize bacterial clumping and plated on tryptic soy agar in duplicates. The assay plate was incubated at 37°C for 1 hour with continuous mixing using rotisserie style shaker. At the end of incubation a 25µl aliquot of suspension was 10 fold serially diluted in sterile 1% saponin solution, mixed by vortexing to and plated on tryptic soy agar in duplicate. The percentage killing was calculated by determining the ratio of the number of cfu surviving at 60 minutes in wells with bacteria, antibodies, complement and HL-60 cells to the number of cfu surviving in tubes lacking antibodies but containing bacteria, complement and HL-60 cells. Controls containing bacteria, complement and mAb was included to adjust for any reduction in cfu due to clumping.

Example 12: Demonstration of a Protective Effect by ClfA in *In Vivo* Animal Models

[0281] To evaluate whether polyclonal rabbit antibodies elicited against ClfA were capable of reducing *S. aureus* colony counts in a murine sepsis model, purified rabbit polyclonal anti-ClfA IgG was used at two dosages (0.8 mg and 1.6 mg) in a passive immunization study (Figure 13). The *S. aureus* challenge strain was a recent clinical isolate, 659-018. Both antibody dosages resulted in a significant reduction of bacterial colony counts in the murine sepsis model ($p=0.0134$ for 1.8 mg dose and $p=0.0013$ for 0.8 mg dose). This experiment has been repeated with additional *S. aureus* isolates with similar results (data not shown).

Example 13: Active Immunization With ClfA Reduced Colonization of the Heart by *S. Aureus*

[0282] Active immunization of rabbits with ClfA resulted in protection in the rabbit endocarditis model. We found a 3–4 log reduction in *S. aureus* cfu recovered from cardiac vegetations for animals immunized with ClfA compared to negative control (PBS or $AlPO_4$) immunized animals (Figure 14).

Example 14: Protective Effect of MntC in *In Vivo* Animal Models

[0283] Active immunization with MntC has shown consistent protection of mice from at early time points following *S. aureus* challenge. Bacterial counts in the blood of mice receiving i.p. *S. aureus* challenge were significantly reduced as compared to controls immunized with PBS (Figures 15A and 15B). Four out of six individual studies showed a significant reduction in cfu/ml blood in immunized animals. Protection mediated by MntC immunization was demonstrated using 2 different *S. aureus* challenge strains, PFESA0237 (Figure 15A) and PFESA0266 (Figure 15B).

Example 15: CP5 Conjugates Protect in Murine Pyelonephritis Model

[0284] CP5 conjugates were evaluated for their ability to protect mice in an active immunization pyelonephritis model. Figure 16 shows the results from several studies. Bacterial counts in the blood of mice receiving i.p. *S. aureus* challenge were significantly reduced as compared to controls immunized with pbs (Figure 16). Six out of six individual studies showed a significant reduction in cfu/ml kidneys in immunized animals. The data showed consistent reduction of kidney colonization after active immunization with CP5 conjugate.

Example 16: CP5 Conjugates Prepared by Different Conjugation Chemistries Protect Mice Against Experimental Infections

[0285] Active immunization studies in the murine pyelonephritis model were conducted using CP5 conjugate prepared either by PDPH or CDT chemistry. The methods for conjugating CP5 or CP8 to CRM_{197} were described above. Results showed that both conjugates significantly reduce colonization in mice compared to the sham immunized animals (Table 14).

Table 14: Effect of PDPH vs. CDT Conjugation in Pyelonephritis Model

Study #	Antigens	Strain/Dose	logCFU/Kidney	Significance
Study 1	Saline+$AlPO_4$	PFESA0266	5.53 ± 1.90	--
	1 µg CP5- CRM_{197} (PDPH) +$AlPO_4$	2×10^8	3.01 ± 1.83	$p < 0.001$
	1 µg CP5- CRM_{197} (CDT) +$AlPO_4$		1.67 ± 0.23	$p < 0.0001$
Study 2	Saline+$AlPO_4$	PFESA0266	6.17 ± 1.76	--
	1 µg CP5- CRM_{197} (PDPH) +$AlPO_4$	2.7×10^8	3.06 ± 1.69	$p < 0.0001$
	1 µg CP5- CRM_{197} (CDT) +$AlPO_4$		1.87 ± 0.69	$p < 0.0001$

Example 17: CP5 Conjugate Protects in a Rat Endocarditis Model

[0286] Four studies were conducted with CP5-CRM_{197} PDPH conjugate and an unrelated conjugate (PP5-CRM_{197}) at 1 µg dose. The CP5 conjugates significantly reduced colonization in both the heart and kidneys in 2 of 3 experiments in which the challenge Type 5 challenge strain was PFESA0266 (Table 15). In the third study, the Geometric Mean Titer (GMT) anti-CP5 titer was the lowest of the three experiments, but it was only slightly lower than the titer in the previous experiment (51,000 vs. 67,000).

Table 15: CP5-CRM_{197} Immunization Reduces cfu in Rat Endocarditis Model

		logCFU Recovered		Significance		GMT
Immunogenic Composition	Challenge Strain/Dose	Heart	Kidney	Heart	Kidney	CP Titer
1 µg CP5-CRM_{197}	PFESA0266	4.34± 1.78	3.92±1.73			103,000
1 µg PP5-CRM_{197}	2.21 x 10^8 cfu	7.94± 0.78	6.77± 0.79	p<0.001	p<0.05	
1 µg CP5-CRM_{197}	PFESA0266	4.43± 2.30	3.109± 2.33			51,000
Saline	6.5 x 10^7 cfu	5.63± 2.48	4.19± 2.05	No	No	
1 µg CP5-CRM_{197}	PFESA0266	4.01± 2.49	3.90± 1.92			67,000
Saline	4.0 x 10^8 cfu	7.52± 1.38	6.52± 1.17	p<0.0002	p<0.0002	
1 µg CP5-CRM_{197}	SA315	8.17± 1.02	6.92± 1.20			186,000
Saline	1 x 10^9 cfu	8.25± 0.60	6.74± 0.95	No	No	

Example 18: CP5-CRM_{197} Conjugates in a Pyelonephritis Model

[0287] Initial studies investigating efficacy of conjugates were performed with 25 kDa MW CP5. Improvements in fermentation process resulted in production of the high MW polysaccharide, which was conjugated to protein carrier and tested side by side with 25 kDa CP5 conjugate. Conjugates comprising CP with MW of 25 kDa (Low MW) and 300 kDa (High MW) were prepared using CDT

conjugation chemistry and evaluated in the murine pyelonephritis model. Three doses (0.01, 0.1 and 1 μg) of the HMW conjugates were tested and compared to the control LMW CP5-CRM_{197} and an unrelated conjugate (PP5-CRM_{197}) at 1 μg dose. The results showed a significant reduction in CFU of *S. aureus* PFESA0266 recovered from the kidneys at a 1 μg dose. There was no statistical difference between protection from conjugates prepared with different size CP5 at the 1 μg dose (Table 16). The lower doses (0.01 μg and 0.1 μg) of the conjugate failed to elicit an immune response sufficient to significantly reduce the infection. The experiment was repeated using an identical immunization and challenge procedure. In the repeated experiment, only the 1 μg dose of LMW CP5-CRM_{197} resulted in a significant reduction in colonization (p=0.01). The 1 μg dose of HMW CP5-CRM_{197} lowered cfu in kidneys, however the reduction was not statistically significant (p=0.056).

Table 16. CP5 Conjugates Protect in a Mouse Pyelonephritis Model.

Study	Antigen	Strain/Dose	logCFU/Kidney	Significance (p value)
1	1 μg PP5-CRM_{197}	PFESA0266 1.7×10^8	5.34	0.0048
	1μg 25kDa CP5-CRM_{197}		2.94	
	1 μg 300kDa CP5-CRM_{197}		2.74	0.0056
	0.1 μg 300kDa CP5-CRM_{197}		5.59	
	0.01 μg 300kDaCP5-CRM_{197}		4.70	
2	1 μg PP5-CRM_{197}	PFESA0266 1.7×10^8	5.35	
	1μg 25kDa CP5-CRM_{197}		3.25	0.01
	1 μg 300kDa CP5-CRM_{197}		3.78	0.06
	0.1 μg 300kDa CP5-CRM_{197}		4.45	
	0.01 μg 300kDa CP5-CRM_{197}		6.08	

Example 19: Polysaccharide O-Acetylation is Important for Induction of Protective Antibody Response to CP5 Conjugate Immunogenic Formulation

[0288] To evaluate the importance of O-Acetylation of CP5, the native CP5 was de-O-acetylated (dOAc) and conjugated to CRM_{197} (dOAc-CRM_{197}) using PDPH

conjugation chemistry. The efficacy of dOAcCP-CRM_{197} conjugate was compared side by side with CP5-CRM_{197} in a murine pyelonephritis model. The results showed that conjugate lacking O-acetyl groups (dOAc CP5- CRM_{197}) is not efficacious in this model as demonstrated by no significant change in the bacterial colonization in kidneys. These data (Table 17) indicate that O- acetylation was important for elicitation of functional antibodies against CP5.

Table 17: Immunization With de-O-acetylated CP5- CRM_{197} Does Not Protect Mice From Kidney Colonization

Study #	Antigens	Strain/Dose	logCFU/Kidney	Significance
Study 1	1 μg PP5- CRM_{197}	PFESA0266	3.89 ± 2.24	
	1 μg dOAc CP5- CRM_{197}	7×10^8	4.20 ± 1.75	
	1 μg CP5- CRM_{197}		1.75 ± 0.39	p-value < 0.008
Study 2	Saline	PFESA0266	5.08 ± 1.96	
	1 μg dOAc CP5- CRM_{197}	2.4×10^8	5.89 ± 1.29	
	1 μg CP5- CRM_{197}		2.93 ± 2.11	p-value < 0.02

Example 20: Immunization with CP8-Conjugate Reduces Death in a Sepsis Model

[0289] The efficacy of CP8-CRM_{197} conjugate was evaluated in the murine sepsis model after challenge with *S. aureus* PFESA0268 (Type 8). Swiss Webster mice (n=30) were actively immunized by subcutaneous injection with 1μg CP8-CRM_{197} and saline both formulated with 100 μg $AlPO_4$. The study showed a significant reduction of sepsis (p=0.0308) as compared to mice immunized with $AlPO_4$ alone. See Figure 17.

Example 21: Evaluation of the Conjugated Native and Base Treated CP8 in the Murine Bacteremia Model

[0290] The importance of O-Acetyl groups present on native CP8 before conjugation for induction of functional antibody responses was evaluated for CP8 conjugate. CP8 polysaccharide was de-O-Acetylated under mild basic conditions and both NMR and Ion Chromatography (IC) confirmed absence of O-Acetylation in CP8 de-O-Ac - CRM_{197}.

[0291] The murine bacteremia model was used to evaluate efficacy of the native versus base treated CP8 conjugated to CRM_{197}. Groups of female BALB/c mice

(15/group) were immunized at weeks 0, 3 and 6, with 1 µg CP8 de-O-Ac - CRM_{197} or 1 µg CP8 O-Ac - CRM_{197}. Immunogenic formulations were formulated with 22 µg $AlPO_4$. Animals were challenged with *S. aureus* PFESA0003. Three hours post challenge the mice were sacrificed and the bacteria were enumerated in blood. The data showed that there was a statistically significant (p=0.0362) reduction in bacterial cfu recovered from the blood of animals immunized with untreated native CP8 conjugate as determined by the student t test (Table 18). In animals that were immunized with base treated CP8 conjugate the bacterial cfu recovered from blood were similar to the saline control group.

Table 18: CP8-CRM_{197} Conjugate Reduces Bacteremia *S. aureus* PFESA0003 in Mice.

Antigen	Strain/Dose	logCFU/Blood	Significance (p value)
Saline	PFESA0003 1.14×10^8	4.35	
CP8 de-O-Ac - CRM_{197}		4.45	
CP8 O-Ac - CRM_{197}		3.93	0.03

Example 22: Confirmation of the Importance of O-Acetylation as Functional Epitope of CP5 by OPA Using MAbs With Known Specificities

[0292] CP5 monoclonal antibodies with specificities to CP5 OAc+ (CP5-7-1), CP5 OAc+/- (CP5-5-1) and CP5 OAc- (CP5-6-1) were evaluated for OP killing activity against type 5 strain PFESA0266 (Table 19). MAb CP8-3-1 specific to CP8 OAc+ was used as negative control. Results showed that CP5-7-1 mAb (CP5 OAc+ specific) mediates killing of both type 5 strains tested. Also mAb CP5-5-1 recognizing epitopes shared by both CP5 OAc+ and CP5 OAc- mediated killing of PFESA0266 strain. The MAb specific for epitopes present on CP5 OAc- polysaccharide did not mediate killing of PFESA0266 strain. These results indicate that O-Acetyl epitopes on CP5 are involved in functional activity of CP5 specific antibodies.

Table 19 mAbs Specific to O-Acetylated (+) CP5 and O- and de-O-Acetylated (+/-) CP5 are Opsonic against *S. aureus* PFESA0266 (Type 5).

	CP5-5-1 (O-Ac +/-) (µg)				CP5-6-1 (O-Ac -) (µg)				CP5-7-1 (O-Ac +) (µg)				CP8-3-1 (neg. control) (µg)			
µg	20	10	5	2.5	20	10	5	2.5	20	10	5	2.5	20	10	5	2.5
% kill	28	33	30	21	-12	-5	-12	-5	31	46	49	55	-18	-3	-13	-5

Data reported as percent killing and was calculated by determining the ratio of the number of cfu surviving at 60 minutes in wells with bacteria, antibodies, complement and HL-60 cells to the number of cfu surviving in wells lacking antibodies but containing bacteria, complement and HL-60 cells.

Example 23: Opsonic Activity of Mouse Antibodies Induced to High and Low MW CP5 Conjugates

[0293] Sera from mice (n=5) with high CP5 ELISA titers from 1 µg high molecular weight and low molecular weight groups from Example 18 were compared for opsonic activity using *S. aureus* PFESA0266. OPA results showed that both conjugates elicited opsonic antibodies in mice (Table 20). There was a trend observed for high MW conjugates to elicit higher titer opsonic antibodies. Data shown as a mean % killing ±SEM for 5 individual mouse sera. Antibodies need to be functional as measured by killing of bacteria in either an animal efficacy model or via an opsonophagocytic killing assay that demonstrates the antibodies kill the bacteria. Functional killing may not be demonstrated using an assay that just monitors the generation of antibodies alone, which is not indicative of the importance of high molecular weight conjugates in efficacy.

Table 20: Both LMW and HMW CP5 conjugates elicit opsonic antibodies

Antigen: 1µg CP5- CRM_{197} (25 kDa)		Antigen: 1 µg CP5- CRM_{197} (300 kDa)	
OPA titer wk0	OPA titer wk8	OPA titer wk0	OPA titer wk8
<100	400	<100	6400
<100	<100	<100	800
<100	400	<100	3200
<100	3200	<100	3200
<100	<100	<100	3200

Example 24: Opsonic Activity of Sera From Mice Immunized With Native and Chemically Modified CP8 Conjugates

[0294] Select mouse sera (n=5) with high CP8 titers from the study in Example 21 were compared for opsonic activity using PFESA0005 strain. The OPA results

(Table 21) show that only conjugates prepared by the conjugation of native CP8 elicited opsonic antibodies in mice. It is noteworthy that the de-OAc CP8 conjugate was immunogenic in mice but the antibodies elicited were not opsonic in this assay. OPA titers are reported as reciprocal of dilution at which 40% killing was observed. Antibodies need to be functional as measured by killing of bacteria in either an animal efficacy model or via opsonophagocytic killing assay that demonstrates the antibodies kill the bacteria. Functional killing may not be demonstrated using an assay that just monitors the generation of antibodies alone, which is not indicative of the importance of O-acetylation in efficacy.

Table 21. Opsonic Activity of Native CP8 vs. de-O-Ac CP8- CRM_{197}

De-O-Ac CP8- CRM_{197}		CP8- CRM_{197}	
OP titer Wk0 sera	OP titer Wk8 sera	OP titer Wk0 sera	OP titer Wk8 sera
<50	<50	50	150
<50	<50	<50	1350
<50	<50	<50	450
<50	<50	<50	1350
<50	<50	<50	4050

Example 25: Killing of Type 8 Strains by CP8 Conjugate Non-Human Primate Antisera is Inhibited by Addition of Native CP8

[0295] To confirm the specificity of the killing activity in the sera of non-human primates immunized with CP8-conjugate, an assay was performed in the presence of native CP8. The OP method II was used with the following modifications. Two fold serial dilutions of antibody samples (25 µl) were prepared and followed by addition of either 150 µl (Pn14 competitor) or 125 µl (CP8 competitor) of assay buffer to the antibody suspension. The competitor was purified CP8 polysaccharide (CP8 poly) and unrelated pneumococcal polysaccharide (Pn 14 poly) was used as a control. The polysaccharides were added (50 µg) to the antibody suspension and the plate incubated at 4°C for 30 minutes with end over end mixing. Following incubation with polysaccharides, bacteria were added (25 µl) to the plates and placed on a rotary shaker at 4 °C for 30 minutes followed by addition of 25 µl of human complement (1% final concentration). The results (Table 22) showed that the presence of native CP8 in reaction mixture inhibited

opsonophagocytic killing of *S. aureus* Type 8 These results confirm that opsonophagocytic killing by immune sera was mediated by capsule specific Abs.

Table 22. Addition of CP 8 Polysaccharide Inhibits Opsonophagocytic Killing Of *S. aureus* by Immune Sera.

Monkey	Sera Sample	OPA titer
02D133	Wk0	<50
	Wk 8	4050
	Wk0 + 20 µg CP8 poly	<50
	Wk8 + 20 µg CP8 poly	<50
	Wk0 + 20 µg Pn14 poly	<50
	Wk 8 + 20 µg Pn 14 poly	4050
A4N122	Wk 0	<50
	Wk 8	4050
	Wk0 + 20 µg CP8 poly	<50
	Wk8 + 20 µg CP8 poly	<50
	Wk0 + 20 µg Pn14 poly	<50
	Wk8 + 20 µg Pn 14 poly	1350

Example 26: Naturally Acquired Antibodies to ClfA Mediate Opsonophagocytic Killing of *S. Aureus*

[0296] Humans in the population are naturally exposed to *S. aureus* and thus have preexisting antibodies to that bacterium in their circulation. We affinity purified anti-ClfA antibodies from human serum and evaluated whether the antibodies could mediate opsonic killing. It has been shown that antibodies to ClfA are opsonic for *S. aureus* capsular polysaccharide (data not shown). Strain PFESA0266 was grown overnight in Columbia broth with 2% NaCl. Bacteria were opsonized with ClfA affinity purified human IgG or irrelevant antigen affinity purified human IgG (negative control, streptococcal SCP protein) and the opsonic activity tested. Differentiated HL-60 cells were used in the opsonophagocytic assay at an effector/target ratio of 100:1. As an additional control, a CP5 mAb was included in the experiment to demonstrate the presence of CP5 on the surface. The results are average of two independent experiments. ClfA and CP5 specific antibodies did mediate opsonic killing and SCP specific (negative control) antibodies had no activity in this assay.

Example 27: CP5-CRM$_{197}$ Conjugate Elicits Opsonic Antibodies in Non-Human Primates (NHP)

[0297] To compare the functionality of high vs. low molecular weight CP5-CRM$_{197}$ conjugates in NHP, groups of five monkeys were immunized with 2 and 20 µg doses of the conjugates with or without $AlPO_4$ adjuvant. The monkeys received the first and second vaccination on day 0 and 28, respectively. Bleeds from day 0, 14, 28 and 42 were tested for OP activity. Results are summarized in Table 23. The 20 µg HMW conjugate had the highest OP titers compared to other groups. Also, the frequency of OP positive monkeys was higher at both doses of the high MW groups than for the corresponding low MW groups. These results demonstrate that there is a trend for HMW CP5-CRM$_{197}$ conjugate to elicit better OP responses than LMW CP5 conjugate in NHP.

Table 23. OPA of NHP serum following immunization with CP5 conjugates.

		OPA Titer (40% Kill)			
Group	Monkey ID	Day 0	Day 14	Day 28	Day 42
20 µg CP5 (HMW)+ 0.5mg/mL $AlPO_4$	A2N053	450	1350	4050	4050
	149N	<100	4050	4050	4050
	A4L069	<100	450	150	<100
	A1N097	<100	4050	1350	1350
	A4L014	<100	<100	<100	<100
2 µg CP5 (HMW))+ 0.5mg/mL $AlPO_4$	02D125	<100	150	150	<100
	A4L081	<100	150	150	150
	A2N055	150	450	150	150
	A4N084	<100	<100	<100	<100
	A1N085	<100	150	450	4050
2 µg CP5 (HMW) no $AlPO_4$	A4L084	150	150	<100	<100
	97N004	150	450	450	450
	A4L055	<100	<100	<100	<100
	97N123	<100	<100	150	150
	225N	<100	<100	<100	<100
20 µg CP5 (LMW))+ 0.5mg/mL $AlPO_4$	02D017	<100	<100	<100	<100
	A4N100	<100	150	150	4050
	257N	<100	<100	<100	<100
	A4L046	<100	<100	<100	<100
	A1N098	<100	150	<100	<100
2 µg CP5 (LMW))+ 0.5mg/mL $AlPO_4$	96N022	150	150	450	150
	02D005	<100	1350	450	1350
	02D113	<100	150	150	<100
	A2N040	150	150	<100	<100
	A4L056	150	150	<100	<100

Example 28: Capsule Polysaccharide Conjugates Comprising High Molecular Weight Polysaccharides Show Enhanced Immunogenicity Compared To Conjugates Comprising Low Molecular Weight Polysaccharides.

[0298] Non human primate (NHP) studies were conducted to evaluate the immunogenicity of different capsule conjugate formulations. Two formulations were tested at two different dosage levels (2 and 20 μg). The first formulation was composed of a high molecular weight (HMW) polysaccharide (approximately 130 kDa) conjugated to CRM_{197}. The second formulation contained a low molecular weight (LMW) polysaccharide (approximately 25 kDa) conjugated to CRM_{197}. Groups of five primates were vaccinated with a single dose of either vaccine and immune titers were monitored prior to vaccination and two weeks post vaccination. OPA titers were defined as the dilution of serum required to kill 40% of *S. aureus* Strain PFESA0266 in an OPA assay. Antibody titers were also monitored by ELISA. Enhanced activity was seen for the HMW vaccine compared to the LMW formulation (Table 24), evidenced by a ten fold rise in antibody titers for the HMW vaccine compared to the LMW vaccine. The OPA responder rate for the NHPs that received the HMW vaccine were also higher (80% compared to 40%).

Table 24. Enhanced Immunogenicity is observed for HMW polysaccharide conjugate vaccines compared to LMW polysaccharide conjugate vaccine.

	CP5-CRM197 dose level (mcg) per animal	Geometric Mean of PD1*	OPA Responder Rate (%)±
HMW (125 kDa)	20	32	80
	2	21	80
LMW (25 kDa)	20	3	40
	2	8	40

* Fold rise calculated from CP5 ELISA titer 2 weeks post vaccination compared to pre vaccine titers. ± Responder rate calculated from monkeys generating a rise in OPA titer following a single dose of vaccine 2 weeks post vaccination. Each group contained 5 Rhesus maccaques and vaccines were formulated with $AlPO_4$ (250 mcg/dose)

Example 29: Bi-Antigen (CP5-CRM$_{197}$ and ClfA) Formulation–Antibody Responses in Non-Human Primates

[0299] To evaluate the immune response to a single dose of two antigen immunogenic compositions (CP5-CRM$_{197}$ and ClfA) in NHP, groups of five monkeys were immunized with different doses of the two antigens without the addition of $AlPO_4$. Bleeds from day 0, 14, and 28 were tested for opsnophagocytic (OP) activity and ELISA titers and the results are summarized in Table 24. Results showed that OP activity was consistently observed with CP5 immunized animals as compared to a CP5 sham group. Overall, the 100 µg group had the highest ELISA and OP titers compared to other groups. There was no OP killing activity observed with sera from the ClfA alone group. No interference was observed in the groups given ascending doses of ClfA or CP5. See Table 25.

Table 25: OPA Results From Bi-Valent Immunization Study In NHP

		OPA Titer (40% Killing)		
Group #	**ID Number**	**Week: 0**	**Week: 2**	**Week: 4**
180 µg ClfA + 20 µg 130 kDa CP5	A4R054	<100	150	<100
	A4R056	<100	150	150
	A4N087	<100	450	450
	97N152	<100	450	1350
	A4R027	<100	1350	1350
180 µg ClfA + 2 µg 130 kDa CP5	A4R062	<100	150	<100
	97N149	<100	150	<100
	A4R131	<100	450	150
	97N025	<100	450	450
	A4N064	<100	450	450
60 µg ClfA + 20 µg 130 kDa CP5	A4L005	<100	<100	<100
	A4R029	<100	1350	1350
	A3N015	<100	<100	<100
	98N021	150	4050	4050
	A4R137	<100	<100	<100
60 µg ClfA + 2 µg 130 kDa CP5	A1N040	<100	150	150
	A2N104	<100	1350	<100
	A4L033	<100	150	<100
	96N048	<100	<100	<100
	A4R032	<100	<100	<100
2 µg 130 kDa CP5	A4R135	<100	450	150
	A1N118	<100	150	150
	A4R061	<100	<100	1350
	A4R101	<100	4050	1350
	97N137	<100	1350	1350

		OPA Titer (40% Killing)		
Group #	ID Number	Week: 0	Week: 2	Week: 4
20 µg 130 kDa CP5	A4R135	<100	<100	<100
	A4N115	<100	150	150
	95N038	<100	<100	<100
	A4N120	<100	450	450
	96N004	<100	150	150
100 µg 130 kDa CP5	A4N116	<100	450	450
	A3N097	<100	450	450
	A4N108	<100	1350	1350
	98N034	<100	450	150
	99N034	<100	1350	4050
60 µg ClfA	97N057	<100	<100	<100
	A4R112	150	<100	150
	A4L022	<100	<100	<100
	97N100	<100	<100	<100
	99N041	150	150	150

Animal Models Demonstrate Potential of *S. aureus* CP5 and CP8 Capsule Polysaccharide Antigens

[0300] Both CP5-CRM_{197} and CP8-CRM_{197} conjugates induced capsular serotype specific antibody responses in mice, rats, rabbits and non-human primates (NHP). Conjugate induced antibodies were functional in the *in vitro* functional opsonophagocytosis killing assay. Data were generated to demonstrate that O-Acetylation is important for elicitation of protective antibodies for both CP5 and CP8, and that O-acetyl groups are part of an epitope recognized by OPA^+ mAbs against CP5. MAbs that recognize native CP5 which is O-acetylated are functional in OPA and mediate killing of the bacteria. CP8 conjugate induced functional antibodies in both mice and rabbits that mediated killing of Type 8 strain in OPA. The specificity of killing by polyclonal or monoclonal antibodies was confirmed by abolition of the killing after addition of the homologous native polysaccharide to the assay. The various active immunization models were used to show preclinical efficacy of both CP5- and CP8-CRM_{197} conjugates. The CP5 conjugate showed consistent efficacy in the murine pyelonephritis model and the rat endocarditis model. The importance of O-acetylation of CP5 was confirmed in the murine pyelonephritis model, where de-O-acetylated CP5 conjugated to CRM_{197} failed to protect animals against experimental infection.

[0301] The combination of the conjugates in a bi-antigen formulation induced antibodies to both capsules CP5 and CP8 and there was no interference to the specific antibody levels induced compared to single antigen immunizations. The combination of conjugates and ClfA in a tri-antigen formulation induced high CP5, CP8 and ClfA levels, and there was no interference to the antibody responses induced against any antigen present in the combination. The tri-antigen immunogenic compositions induced antibody (Ab) responses capable of being boosted to all three components in rabbits with high pre-immune titers.

[0302] These results suggest that CP5 and CP8 conjugated to CRM_{197} should be included as immunogenic formulation components of a protective *S. aureus* immunogenic composition.

Example 30: Requirement of Different Antigens to Protect from Multiple Possible *S. aureus* Diseases

[0303] *S. aureus* cause a wide array of infections ranging from relatively mild skin infections to more serious and invasive infections such as endocarditis, necrotizing fasciitis, osteomyelitis, septic arthritis and pneumonia. Each of these *in vivo* sites is unique and the bacteria likely respond to the differences in environmental stimuli by altering their antigen expression profiles to ones most suitable for the individual strain to colonize, grow and ultimately cause disease. As exemplified in Example 12, *S. aureus* strains show diversity of antigen expression *in vivo*. A multi-component immunogenic composition composed of different antigens is more likely to protect against the diverse disease manifestation caused by *S. aureus*.

[0304] ClfA was shown to protect in rodent endocarditis and sepsis models. ClfB has been reported to be important in nasal colonization of *S. aureus*. MntC protected mice in a murine bacteremia model. The CP5 conjugate protected in pyelonephritis and endocarditis, and the CP8 conjugate protected in rodent pyelonephritis and sepsis models. These results demonstrate that a multi-component vaccine containing these antigens will protect against multiple types of *S. aureus* disease.

[0305] *In vivo* animal models approximate the course of an actual infection and help to elucidate which antigens may be useful in protecting from a particular

disease. Table 26 summarizes results from numerous experiments performed in various *in vivo* models. The results are reported in each block as four numbers separated by a slash, for example ClfA in a sepsis model has the numbers 27/1/3/31. The first number represents the number of experiments where ClfA immunization produced a statistically significant positive result of protection. The second number represents the number of experiments where ClfA immunization produced a positive result of protection that trended toward significance but was not statistically significant. The third number represents the number of experiments where ClfA immunization produced a negative result, but was not statistically significant. The fourth number is the total number of experiments performed. The first three numbers should add up to equal the fourth number.

Table 26. Summary Of Protection In Animal Models For *S. aureus* Antigens

	ClfA	CP5	CP8	MntC[20]
Bacteremia	1/4/0/5	3/0/3/6	1/1/1/3	6/2/5/13
Sepsis	27/1/3/31	1/0/0/1	NT	NT
Pyeloncphritis	0/4/2/6	13/1/0/14	NT	1/0/4/5[25]
Endocarditis	3/6/1/10	3/2/2/7	NT	NT

NT: Not Tested

Example 31: Testing of Various Multi-antigen Immunogenic Compositions *in vitro* and *in vivo*

[0306] Various multi-antigen staphylococcal immunogenic formulations containing either three, four or five antigens selected from the following polypeptides and/or polysaccharides are tested for immunogenicity and efficacy in various *in vivo* models: ClfA, ClfB, MntC, CP5- and CP8. The immunogenic compositions are as follows:

[0307] (1) an immunogenic composition comprising: an isolated *S. aureus* clumping factor A (ClfA) polypeptide, an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 5 conjugated to CRM_{197}, and an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 8 conjugated to CRM_{197};

[0308] (2) A second combination provides clumping factor A (ClfA), clumping factor B (ClfB), an isolated MntC, isolated staphylococcal capsular polysaccharide CP5 conjugated to CRM_{197}, and isolated staphylococcal capsular polysaccharide CP8 conjugated to CRM_{197};

[0309] (3) A third combination provides an immunogenic composition comprising: an isolated *S. aureus* clumping factor A (ClfA) polypeptide, an isolated *S. aureus* clumping factor B (ClfB) polypeptide, or an isolated *S. aureus* MntC protein, an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 5 conjugated to CRM_{197}, and an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 8 conjugated to CRM_{197}; isolated

[0310] (4) A fourth combination provides an immunogenic composition comprising: an isolated *S. aureus* clumping factor B (ClfB) polypeptide, an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 5 conjugated to CRM_{197}, and an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 8 conjugated to CRM_{197};

[0311] (5) A fifth combination provides an immunogenic composition comprising: an isolated *S. aureus* clumping factor B (ClfB) polypeptide, an isolated *S. aureus* MntC protein, an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 5 conjugated to CRM_{197}, and an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 8 conjugated to CRM_{197}; and

[0312] (6) A sixth combination provides an immunogenic composition comprising: an isolated *S. aureus* clumping factor A (ClfA) polypeptide, an isolated *S. aureus* clumping factor B (ClfB) polypeptide, and an isolated *S. aureus* MntC protein.

[0313] rClfA and rClfB are prepared and purified as described in Example 1. MntC is prepared and purified as described in Example 2. Isolated CP5 and CP8 are prepared and purified as described in Example 3 and are conjugated to CRM_{197} as described in Example 4.

[0314] More particularly, the procedures described in the previous Examples above are used to measure immunogenicity and efficacy. Studies are done to determine whether each of the three, four or five components, when delivered alone, or together, induce an immune response. These same studies are used to determine whether or not the presence of any one of the four or five components

interferes with the ability of any of the other three or four components to induce an immune response. Moreover, studies are done to determine whether the four or five components when tested alone, or when tested together, will confer protection in any one or more of the animal models described above. The four or five components are administered as a single dose or as multiple doses to an animal, *e.g.* mice, rats, rabbits or non-human primates, as noted in the previous examples above. The animals are bled and the serum collected and tested for the presence of antibodies to each of the four or five components. The presence of antigen specific antibodies is measured by any immunoassay known to those skilled in the art, for example, an ELISA (See Examples 11-29) or a Western blot (See Example 1) is used to assess the presence or absence of antigen-specific antibodies. In addition, an opsonophagocytic assay is used to determine whether the antigen specific antibodies are effective at mediating killing of the staphylococcal organisms by phagocytic cells (See Examples 11-29).

[0315] *In vivo* efficacy is also assessed using any one or more of the animal studies described above, such as, but not limited to, the in-dwelling tubing model; the murine bacteremia model; the wound infection model; the murine pyelonephritis model; the rat endocarditis model and the murine sepsis model (See Examples 11-30).

Example 32: Combinations of *S. Aureus* Antigens Generate Antibodies in Non-Human Primates That Enhance Killing of *S. Aureus* Strain Pfe5-1.

[0316] Enhanced efficacy, as measured using the OPA assay, was observed using combinations of antigens. A non-human primate study was conducted where groups of 3-10 monkeys were immunized with multi-component vaccines. Animals received a single dose of vaccine and OPA titers were monitored at day 0 and two weeks post vaccination. OPA titers were defined as the dilution of serum required to kill 50% of *S. aureus* Strain Pfe5-1 in an OPA assay. Enhanced activity was seen for a combination of 4 antigens compared to a 3-antigen vaccine formulation ($p=0.0272$; Figure 18).

What is Claimed is:

1. An immunogenic composition comprising at least three components selected from the group consisting of: an isolated *S. aureus* clumping factor A (ClfA) polypeptide, an isolated *S. aureus* clumping factor B (ClfB) polypeptide, an isolated *S. aureus* MntC protein, an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 5 conjugated to a carrier protein, and an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 8 conjugated to a carrier protein.

2. An immunogenic composition comprising: an isolated *S. aureus* clumping factor A (ClfA) polypeptide, an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 5 conjugated to a carrier protein, and an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 8 conjugated to a carrier protein.

3. The immunogenic composition of claim 2, further comprising an isolated *S. aureus* clumping factor B (ClfB) polypeptide.

4. The immunogenic composition of claim 2 or claim 3, further comprising an isolated *S. aureus* MntC protein.

5. The immunogenic composition of any of claims 1-4 , wherein the ClfA or the ClfB polypeptide is a polypeptide fragment comprising the fibrinogen binding domain of ClfA or ClfB.

6. The immunogenic composition of claim 5, wherein the ClfA or ClfB polypeptide fragment is a fibrinogen binding domain comprising the N1, N2 and N3 domains of ClfA or ClfB.

7. The immunogenic composition of claim 5, wherein the ClfA or ClfB polypeptide fragment is a fibrinogen binding domain comprising the N2 and N3 domains of ClfA or ClfB.

8. The immunogenic composition according to any of claims 5 6, or 7, wherein the fibrinogen binding domain of ClfA binds to fibrinogen at a reduced level compared to the binding observed to fibrinogen with the native fibrinogen binding domain of ClfA.

9. The immunogenic composition of claim 8, wherein the fibrinogen binding domain of ClfA binds to fibrinogen at a reduced level compared to the binding observed to fibrinogen with the native fibrinogen binding domain of ClfA through having an amino acid substitution at one or more of Tyr 338, Tyr 256, Pro 336, Lys 389, Ala 254 and Ile 387.

10. The immunogenic composition of claim 9, wherein the amino acid substitution at one or more of Tyr 338, Tyr 256, Pro 336, Lys 389, Ala 254 and Ile 387 is to Ala or Ser.

11. The immunogenic composition of claim 10, wherein the Tyr 338 is substituted to Ala.

12. The immunogenic composition of any of claims 1-11, wherein the ClfA, the ClfB, or MntC is produced recombinantly.

13. The immunogenic composition of any one of claims 1-12, wherein the capsular polysaccharide type 5 is a high molecular weight capsular polysaccharide of between 20 and 1000 kDa.

14. The immunogenic composition of claim 13, wherein the high molecular weight capsular polysaccharide type 5 has a molecular weight of between 70 and 300 kDa.

15. The immunogenic composition of any of claims 1-14 wherein the capsular polysaccharide type 5 is between 10% and 100% O-acetylated.

16. The immunogenic composition of any of claims 1-14, wherein the capsular polysaccharide type 5 is between 50 and 100% O-acetylated.

17. The immunogenic composition of any of claims 1-14, wherein the capsular polysaccharide type 5 is between 75% and 100% O-acetylated.

18. The immunogenic composition of any of claims 1-17, wherein the capsular polysaccharide type 8 is a high molecular weight capsular polysaccharide of between 20 and 1000 kDa.

19. The immunogenic composition of claim 18, wherein the high molecular weight capsular polysaccharide type 8 has a molecular weight of between 70 and 300 kDa.

20. The immunogenic composition of any of claims 1-19 wherein the capsular polysaccharide type 8 is between 10% and 100% O-acetylated.

21. The immunogenic composition of any of claims 1-19, wherein the capsular polysaccharide type 8 is between 50 and 100% O-acetylated.

22. The immunogenic composition of any of claims 1-19, wherein the capsular polysaccharide type 8 is between 75% and 100% O-acetylated.

23. The immunogenic composition of any of claims 1-22, wherein the carrier protein is the *C. diphtheriae* toxoid CRM_{197}.

24. The immunogenic composition of any of claims 1 or 4-23, wherein the *S. aureus* MntC protein is a lipidated protein.

25. The immunogenic composition of any of claims 1 or 4-23, wherein the *S. aureus* MntC protein is not a lipidated protein.

26. An immunogenic composition comprising: an isolated *S. aureus* clumping factor B (ClfB) polypeptide, an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 5 conjugated to a carrier protein, and an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 8 conjugated to a carrier protein.

27. The immunogenic composition of claim 23, further comprising an isolated *S. aureus* MntC protein.

28. The immunogenic composition of either of claims 26 or 27, wherein the ClfB polypeptide is a polypeptide fragment comprising the fibrinogen binding domain of ClfB.

29. The immunogenic composition of claim 28, wherein the ClfB polypeptide fragment is a fibrinogen binding domain comprising the N1, N2 and N3 domains of ClfB.

30. The immunogenic composition of claim 28, wherein the ClfB polypeptide fragment is a fibrinogen binding domain comprising the N2 and N3 domains of ClfB.

31. The immunogenic composition according to any of claims 28, 29 and 30, wherein the fibrinogen binding domain of ClfB binds to fibrinogen at a reduced level compared to the binding observed to fibrinogen with the native fibrinogen binding domain of ClfB.

32. The composition of any of claims 26-31, wherein the ClfB or the MntC protein is produced recombinantly.

33. The immunogenic composition of any of claims 26-32, wherein the capsular polysaccharide type 5 is a high molecular weight capsular polysaccharide of between 20 and 1000 kDa.

34. The immunogenic composition of any of claims 26-32, wherein the high molecular weight capsular polysaccharide type 5 has a molecular weight of between 70 and 300 kDa.

35. The immunogenic composition of any of claims 26-34 wherein the capsular polysaccharide type 5 is between 10% and 100% O-acetylated.

36. The immunogenic composition of any of claims 26-34, wherein the capsular polysaccharide type 5 is between 50 and 100% O-acetylated.

37. The immunogenic composition of any of claims 26-34, wherein the capsular polysaccharide type 5 is between 75% and 100% O-acetylated.

38. The immunogenic composition of any of claims 26-37, wherein the capsular polysaccharide type 8 has a molecular weight of between 20 and 1000 kDa.

39. The immunogenic composition of any of claims 26-37, wherein the capsular polysaccharide type 8 has a molecular weight of between 70 and 300 kDa.

40. The immunogenic composition of any of claims 26-39 wherein the capsular polysaccharide type 8 is between 10% and 100% O-acetylated.

41. The immunogenic composition of any of claims 26-39, wherein the capsular polysaccharide type 8 is between 50 and 100% O-acetylated

42. The immunogenic composition of any of claims 26-39, wherein the capsular polysaccharide type 8 is between 75% and 100% O-acetylated.

43. The immunogenic composition of any of claims 27-42, wherein the *S. aureus* MntC is a lipidated protein.

44. The immunogenic composition of any of claims 27-42, wherein the *S. aureus* MntC is not a lipidated protein.

45. The immunogenic composition of any of claims 26-44, wherein the carrier protein is the *C. diphtheriae* toxoid CRM197.

46. An immunogenic composition comprising: an isolated *S. aureus* clumping factor A (ClfA) polypeptide, an isolated *S. aureus* clumping factor B (ClfB) polypeptide, and an isolated *S. aureus* MntC protein.

47. The immunogenic composition of claim 46, wherein the ClfA polypeptide is a polypeptide fragment comprising the fibrinogen binding domain of ClfA.

48. The immunogenic composition of claim 47, wherein the ClfA polypeptide fragment is a fibrinogen binding domain comprising the N1, N2 and N3 domains of ClfA.

49. The immunogenic composition of claim 47, wherein the ClfA polypeptide fragment is a fibrinogen binding domain comprising the N2 and N3 domains of ClfA.

50. The immunogenic composition according to any of claims 47, 48 and 49, wherein the fibrinogen binding domain of ClfA binds to fibrinogen at a reduced level compared to the binding observed to fibrinogen with the native fibrinogen binding domain of ClfA.

51. The immunogenic composition of claim 50, wherein the fibrinogen binding domain displays reduced binding to fibrinogen through having an amino acid substitution at one or more of Tyr 338, Tyr 256, Pro 336, Lys 389, Ala 254 and Ile 387.

52. The immunogenic composition of claim 51, wherein the amino acid substitution at one or more of Tyr 338, Tyr 256, Pro 336, Lys 389, Ala 254 and Ile 387 is to Ala or Ser.

53. The immunogenic composition of claim 52, wherein the Tyr 338 is substituted to Ala.

54. The immunogenic composition of any of claims 46-53, wherein the *S. aureus* ClfB polypeptide is a polypeptide fragment comprising the fibrinogen binding domain of ClfB.

55. The immunogenic composition of claim 54, wherein the *S. aureus* ClfB polypeptide fragment is a fibrinogen binding domain comprising the N1, N2 and N3 domains of ClfB.

56. The immunogenic composition of claim 54, wherein the *S. aureus* ClfB polypeptide fragment is a fibrinogen binding domain comprising the N2 and N3 domains of ClfB.

57. The immunogenic composition of any of claims 46-56, wherein the *S. aureus* MntC is a lipidated protein.

58. The immunogenic composition of any of claims 46-56, wherein the *S. aureus* MntC is not a lipidated protein.

59. An immunogenic composition comprising: an isolated *S. aureus* MntC protein, an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 5 conjugated to a carrier protein, and an isolated *S. aureus* capsular polysaccharide type 8 conjugated to a carrier protein.

60. The composition of claim 59, wherein the MntC protein is produced recombinantly.

61. The immunogenic composition of claims 59 or 60, wherein the capsular polysaccharide type 5 is a high molecular weight capsular polysaccharide of between 20 and 1000 kDa.

62. The immunogenic composition of any of claims 59-61, wherein the high molecular weight capsular polysaccharide type 5 has a molecular weight of between 70 and 300 kDa.

63. The immunogenic composition of any of claims 59-62 wherein the capsular polysaccharide type 5 is between 10% and 100% O-acetylated.

64. The immunogenic composition of any of claims 59-62, wherein the capsular polysaccharide type 5 is between 50 and 100% O-acetylated

65. The immunogenic composition of any of claims 59-62, wherein the capsular polysaccharide type 5 is between 75% and 100% O-acetylated.

66. The immunogenic composition of any of claims 59-65, wherein the capsular polysaccharide type 8 has a molecular weight of between 20 and 1000 kDa.

67. The immunogenic composition of any of claims 59-65, wherein the capsular polysaccharide type 8 has a molecular weight of between 70 and 300 kDa.

68. The immunogenic composition of any of claims 59-67 wherein the capsular polysaccharide type 8 is between 10% and 100% O-acetylated.

69. The immunogenic composition of any of claims 59-67, wherein the capsular polysaccharide type 8 is between 50% and 100% O-acetylated.

70. The immunogenic composition of any of claims 59-67, wherein the capsular polysaccharide type 8 is between 75% and 100% O-acetylated.

71. The immunogenic composition of any of claims 1-70, further comprising at least one protein from the serine-aspartate repeat (Sdr) protein family selected from the group consisting of SdrC, SdrD and SdrE.

72. The immunogenic composition of any of claims 1-71, further comprising the iron surface determinant B (IsdB) protein.

73. The immunogenic composition of any of claims 1- 72, further comprising an adjuvant.

74. The immunogenic composition of any of claims 1-73, further comprising a pharmaceutically acceptable carrier.

75. The immunogenic composition of any of claims 1-74, further comprising any one of the following antigens: Opp3a, DltD, HtsA, LtaS, IsdA, IsdC, SdrF, SdrG, SdrH, SrtA, SpA, Sbi FmtB, alpha-hemolysin (hla), beta-hemolysin, fibronectin-binding protein A (fnbA), fibronectin-binding protein B (fnbB), coagulase, Fig, map, Panton-Valentine leukocidin (pvl), alpha-toxin and its variants, gamma-toxin (hlg) and variants, ica, immunodominant ABC transporter, Mg2+ transporter, Ni ABC transporter, RAP, autolysin, laminin receptors, IsaA/PisA, IsaB/PisB , SPOIIIE, SsaA, EbpS, Sas A, SasF, SasH, EFB (FIB), SBI, Npase. EBP, bone sialo binding protein II, aureolysin precursor (AUR)/Sepp1, Cna, and fragments thereof such as M55, TSST-1, mecA, poly-N-acetylglucosamine (PNAG/dPNAG) exopolysaccharide, GehD, EbhA, EbhB, SSP-1, SSP-2, HBP, vitronectin binding protein, HarA, EsxA, EsxB, Enterotoxin A, Enterotoxin B, Enterotoxin C1, and novel autolysin.

76. A method of inducing an immune response against *Staphylococcus aureus* comprising administering to a subject an immunologically effective amount of an immunogenic composition of any of claims 1-75.

77. The method of claim 76, wherein the immune response prevents or reduces a disease or condition associated with a staphylococcal organism in a subject, or prevents or reduces one or more symptoms associated with a staphylococcal organism in a subject.

78. The method of claim 77, wherein the disease is selected from the group consisting of invasive *S. aureus* disease, sepsis and carriage.

79. The method of claim 76, wherein the subject is undergoing a surgical procedure.

80. The method of claim 79, wherein the surgical procedure is an elective surgical procedure or a non-elective surgical procedure.

81. The method of claim 79, wherein the surgical procedure is a cardio-thoracic surgical procedure.

82. The method of claim 76, wherein the immune response induced comprises the generation of antibodies having opsonophagocytic activity (OPA) against *S. aureus*.

83. The method of claim 76, wherein the immune response induced comprises the generation of significantly higher titers of opsonophagocytic antibodies specific for *S. aureus* compared to that observed in non-immunized subjects.

84. The method of claim 83, wherein the opsonophagocytic titer is at least 1:20.

85. The method of any of claims 76-84, wherein the *S. aureus* is MSSA.

86. The method of any of claims 76-84, wherein the *S. aureus* is VRSA.

87. The method of any of claims 76-84, wherein the *S. aureus* is VISA.

88. The method of any of claims 76-84, wherein the *S. aureus* is MRSA.

89. The method of any one of claims 76-88, wherein the subject is a human, a household pet, or a livestock animal.

90. A method of conferring passive immunity to a subject comprising the steps of (1) generating an antibody preparation using an immunogenic compositions of any one of claims 1-75; and (2) administering the antibody preparation to the subject to confer passive immunity.

FIGURE 1

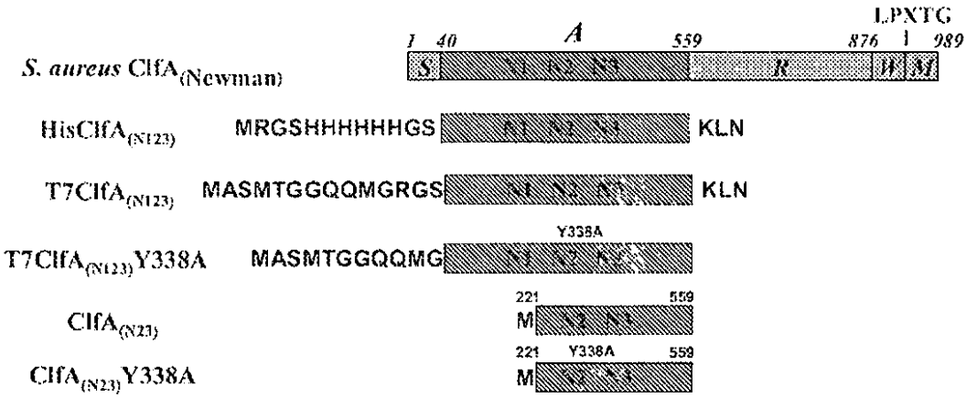

LPXTG
1 40 A 559 876 1 989
S. aureus ClfA(Newman)
S N1 N2 N3 R W M
HisClfA(N123)
MRGSHHHHHHGS N1 N2 N3 KLN
T7ClfA(N123)
MASMTGGQQMGRGS N1 N2 N3 KLN
Y338A
T7ClfA(N123)Y338A
MASMTGGQQMG N1 N2 N3
221 559
ClfA(N23)
M N2 N3
221 Y338A 559
ClfA(N23)Y338A
M N2 N3

FIGURE 2

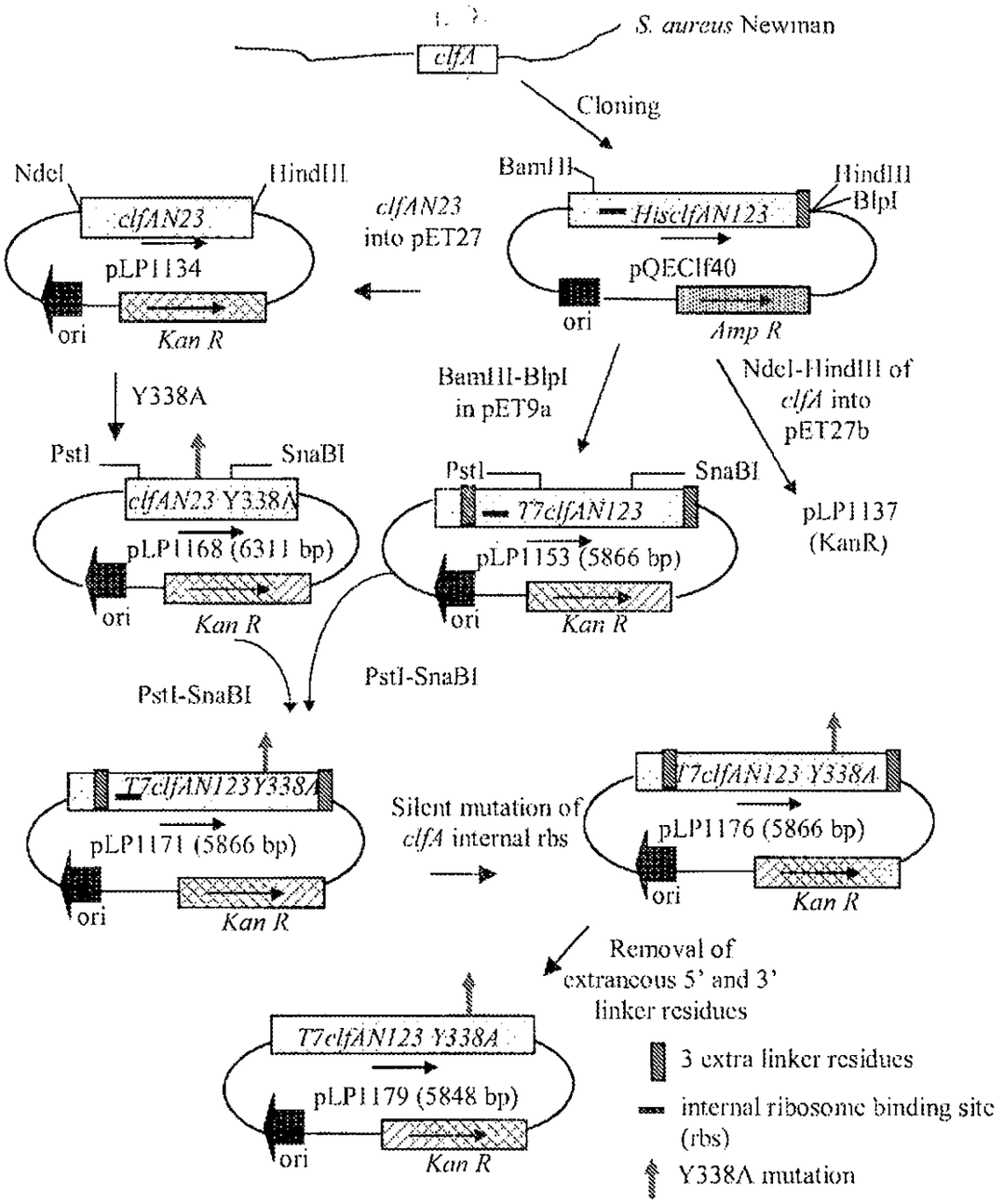

S. aureus Newman
clfA
Cloning
NdeI
HindIII
clfAN23
pLP1134
ori
Kan R
clfAN23 into pET27
BamHI
HindIII
BlpI
HisclfAN123
pQECIf40
ori
Amp R
Y338A
BamHI-BlpI in pET9a
NdeI-HindIII of clfA into pET27b
PstI
SnaBI
clfAN23 Y338A
pLP1168 (6311 bp)
ori
Kan R
PstI
SnaBI
T7clfAN123
pLP1153 (5866 bp)
ori
Kan R
pLP1137 (KanR)
PstI-SnaBI
PstI-SnaBI
T7clfAN123Y338A
pLP1171 (5866 bp)
ori
Kan R
Silent mutation of clfA internal rbs
T7clfAN123 Y338A
pLP1176 (5866 bp)
ori
Kan R
Removal of extraneous 5' and 3' linker residues
T7clfAN123 Y338A
pLP1179 (5848 bp)
ori
Kan R
3 extra linker residues
internal ribosome binding site (rbs)
Y338A mutation

FIGURE 3

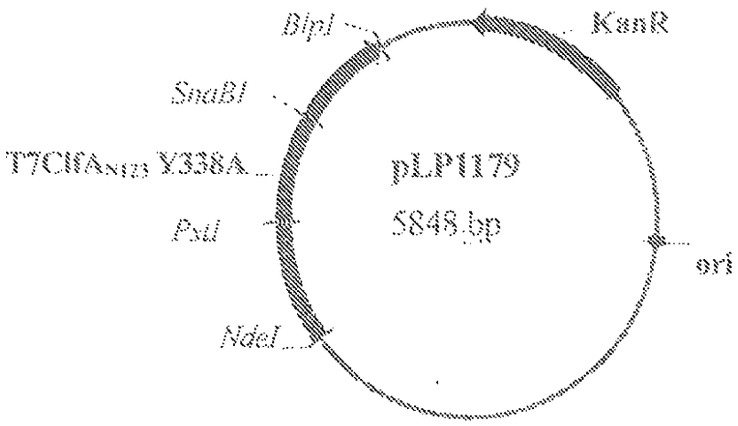
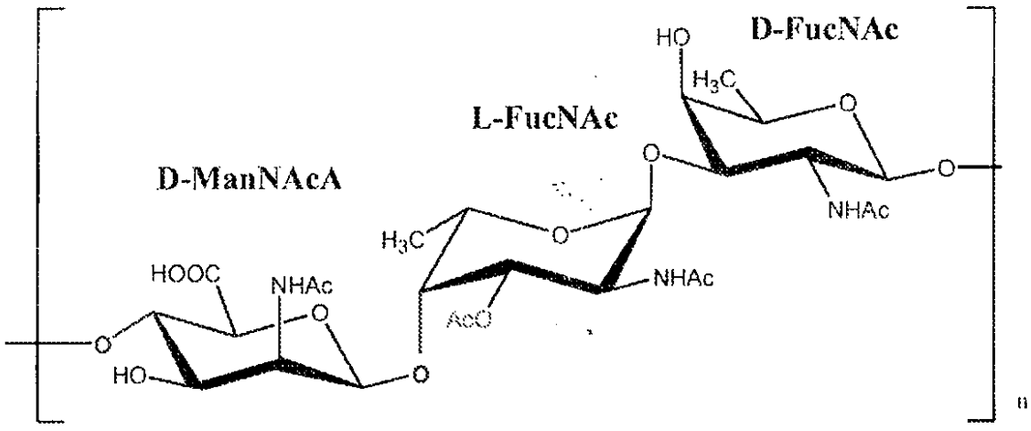
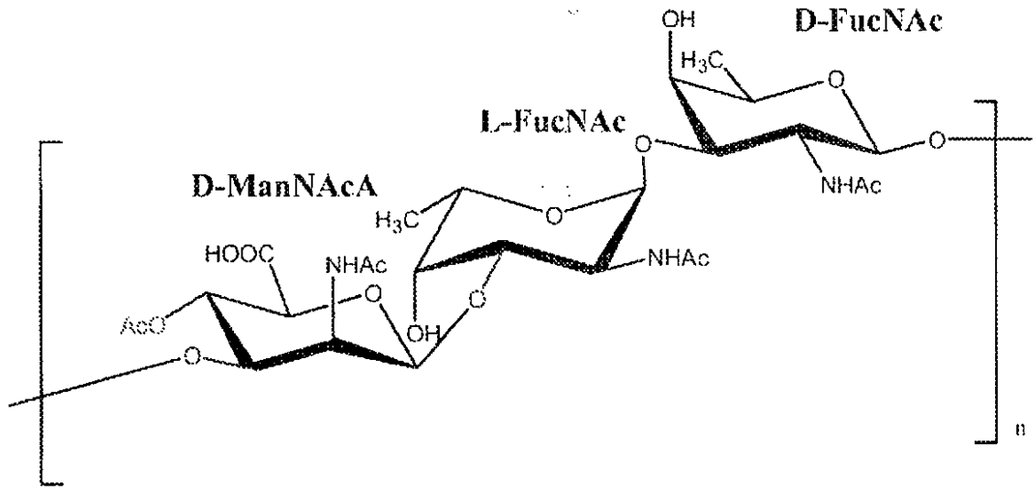

BlpI
KanR
SnaBI
T7ChiA$_{N172}$ Y338A
pLP1179
5848 bp
PstI
ori
NdeI

FIGURE 4



Type 5 CP

[-4)-β-D-ManNAcA-(1-4)-α-L-FucNAc(3-O-Ac)-(1-3)-β-D-FucNAc-(1-]$_n$

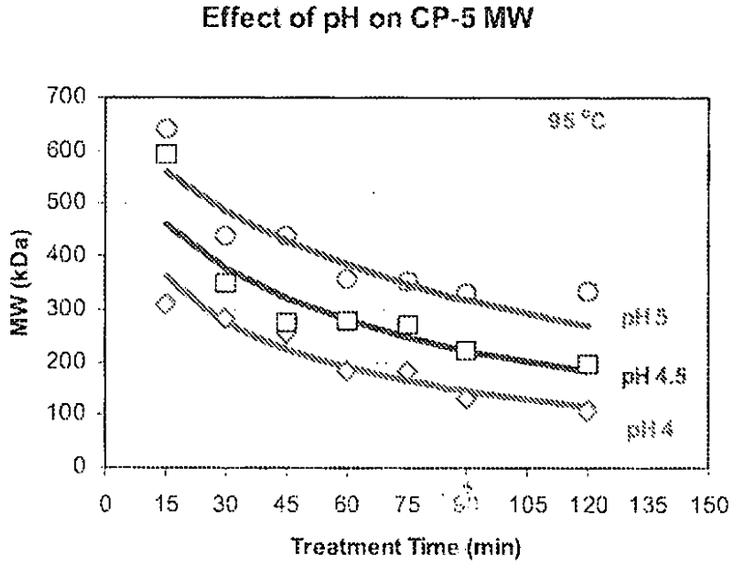


Type 8 CP

[-3)-β-D-ManNAcA(4-O-Ac)-(1-3)-α-L-FucNAc-(1-3)-α-D-FucNAc-(1-]$_n$

FIGURE 5

A.


Effect of pH on CP-5 MW
95 °C
pH 5
pH 4.5
pH 4
MW (kDa)
Treatment Time (min)
0
100
200
300
400
500
600
700
0
15
30
45
60
75
90
105
120
135
150

B.

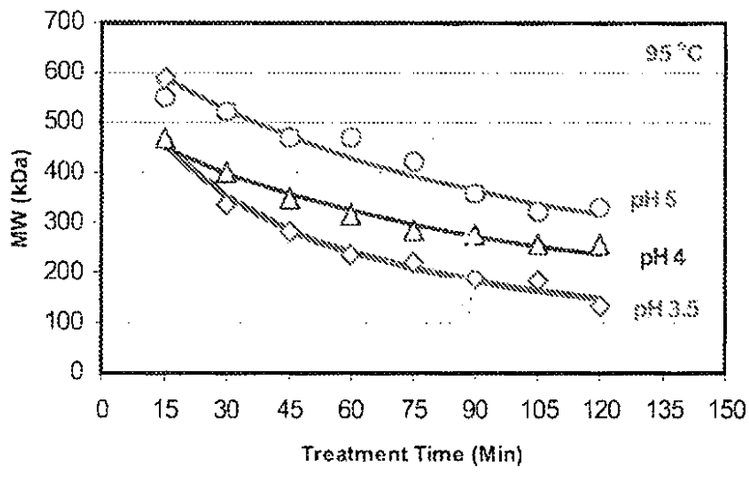
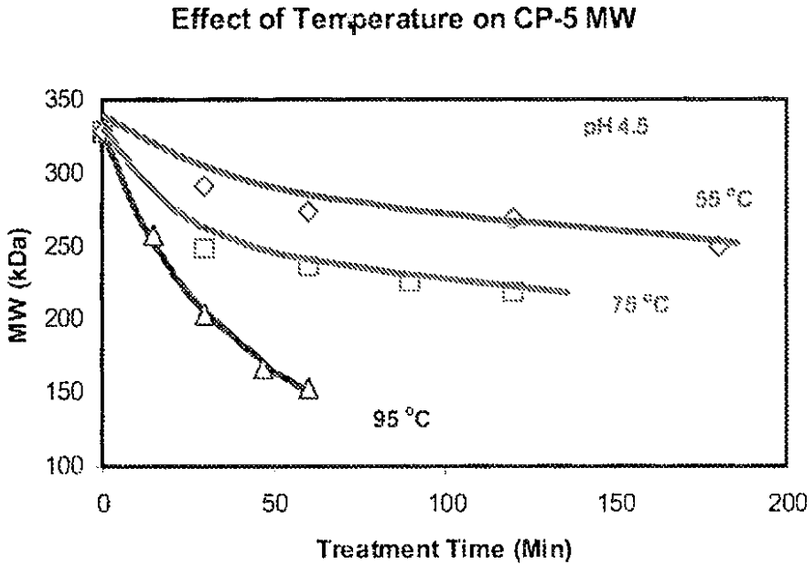

Effect of pH on CP-8 MW
95 °C
pH 5
pH 4
pH 3.5
MW (kDa)
Treatment Time (Min)
0
100
200
300
400
500
600
700
0
15
30
45
60
75
90
105
120
135
150

FIGURE 6

A.


Effect of Temperature on CP-5 MW
MW (kDa)
350
300
250
200
150
100
0
50
100
150
200
Treatment Time (Min)
pH 4.5
55 °C
75 °C
95 °C

B.

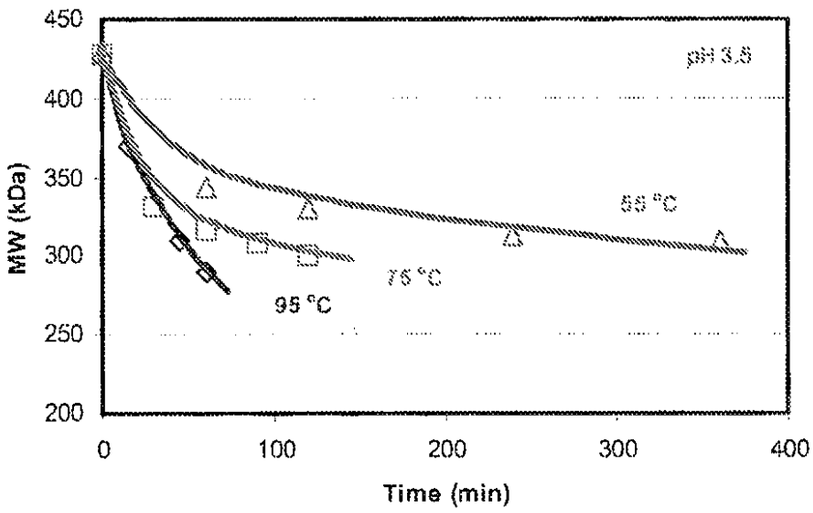

Effect of Temperature on CP-8 MW
MW (kDa)
450
400
350
300
250
200
0
100
200
300
400
Time (min)
pH 3.8
55 °C
75 °C
95 °C

FIGURE 7

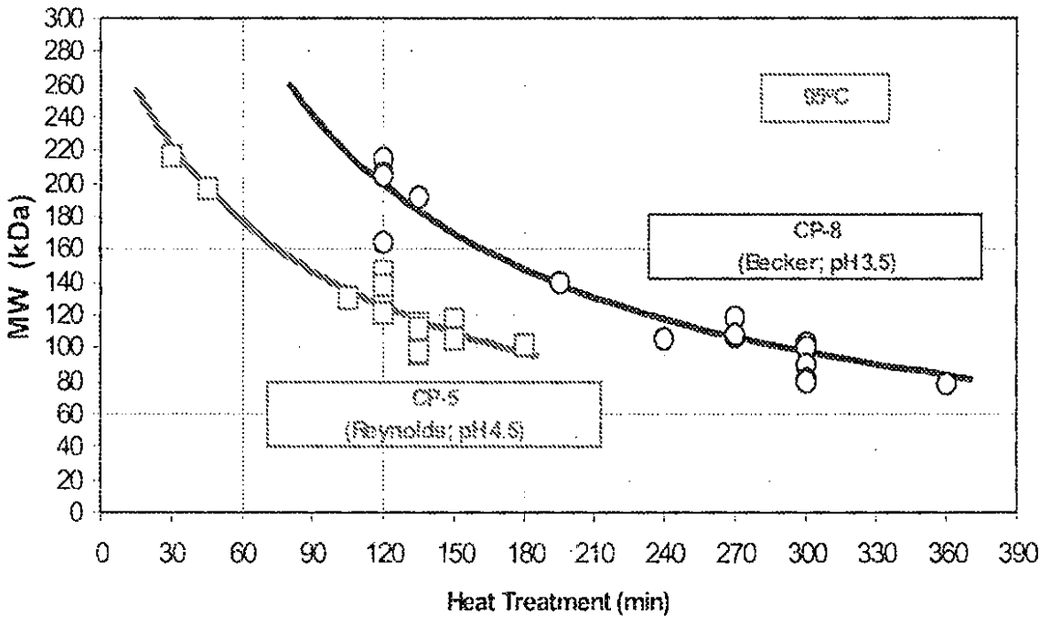

300
280
260
240
220
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
MW (kDa)
0
30
60
90
120
150
180
210
240
270
300
330
360
390
Heat Treatment (min)
95°C
CP-8
(Becker; pH3.5)
CP-5
(Reynolds; pH4.5)

FIGURE 8A ClfA align 1/5

```
                        10        20        30        40        50        60
                ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
clfA_001[22]  MNMKKKEKHAIRKKSIGVASVLVGTLIGFGLLSSKEADASENSVTQSDSASNESKSNDSS
clfA_002[19]  ..........................................................
clfA_004[15]  .....Q.....................................M..TENT.....P.
clfA_012[10]  ..........................................................
clfA_005[5]   ..........................................................
clfA_022[5]   ..........................................................
clfA_003[4]   ..........................................................
clfA_009[4]   .....Q.....................................TENT.....
clfA_013[3]   ..........................................................
clfA_014[3]   ..........................................................
clfA_015[3]   ..........................................................
clfA_006[2]   ..........................................................
clfA_007[2]   ..........................................................
clfA_008[2]   ..........................................................
clfA_010[2]   ..........................................................
clfA_017[2]   ..........................................................P.
clfA_011[1]   ..........................................................
clfA_016[1]   ..........................................................
clfA_018[1]   ..........................................................
clfA_019[1]   ..........................................................
clfA_020[1]   ..........................................................
clfA_021[1]   ..........................................................
clfA_023[1]   ..........................................................NP.
clfA_024[1]   .....Q.....................................M..TENT.....P.

                        70        80        90        100       110       120
                ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
clfA_001[22]  SVSAAPKTDDTNVSDTKTSSNTNNGETSVAQNPAQQETTQSSSTNATTEETPVTGEATTT
clfA_002[19]  ..........................................................
clfA_004[15]  ..N......N.....SN.TT...SD..N.............A.............V...
clfA_012[10]  ..........................................AL..............-
clfA_005[5]   .IN......N.......PT.......................A...............
clfA_022[5]   ........V.........T....S..................A.........A.......
clfA_003[4]   ..........................................................
clfA_009[4]   ..N......N.....SN.TT...SD..N.............A.............V...
clfA_013[3]   ..........................................AL.........L......A
clfA_014[3]   ..N......N........T.............YL.......V...............-
clfA_015[3]   ..........................................AL..............A
clfA_006[2]   ..........................................................
clfA_007[2]   .IN......N........T.......................A.............T...
clfA_008[2]   ..N......N........T.....................I..A...............
clfA_010[2]   ..........................................................
clfA_017[2]   ..N......N.....................................L..........-
clfA_011[1]   ..........................................................
clfA_016[1]   ..........................................................
clfA_018[1]   ..................................L.......................
clfA_019[1]   ..........................................AL.........L......A
clfA_020[1]   ..........................................AL..............A
clfA_021[1]   ..........................................................
clfA_023[1]   ..N......N........T.....S..................A.............G...
clfA_024[1]   ..N......N.....SN.TT...SD..N.............A.............V...
```

FIGURE 8B ClfA align 2/5

```
                    130        140        150        160        170        180
                    ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
clfA_001[22] TTNQANTPATTQSSNTNAEELVNQTSNETTSNDTNTVSSVNSPQNSTNAENVSTTQDTST
clfA_002[19] ..................................................................
clfA_004[15] A.................S................................................I..
clfA_012[10] A.................................................................
clfA_005[5]  ..................................................................
clfA_022[5]  A.....................N...........................................
clfA_003[4]  ..................................................................
clfA_009[4]  A................KS................................................
clfA_013[3]  .-................................................................
clfA_014[3]  A.................................................................
clfA_015[3]  .-................................................................
clfA_006[2]  ..................................................................
clfA_007[2]  A.................................................................
clfA_008[2]  A.K...............................................................
clfA_010[2]  ..................................................................
clfA_017[2]  A.................................................................
clfA_011[1]  ............................F.....................................
clfA_016[1]  A.................................................................
clfA_018[1]  ..................................................................
clfA_019[1]  .-................................................................
clfA_020[1]  .-................................................................
clfA_021[1]  ..................................................................
clfA_023[1]  A........A...N.....................................................
clfA_024[1]  A.................S................................................I..

                    190        200        210        220        230        240
                    ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
clfA_001[22] EATPSNNESAPQSTDASNKDVVNQAVNTSAPRMPAFSLAAVAADAPAAGTDILTNQLTNVT
clfA_002[19] ............N.........S....P.T.........................D.K
clfA_004[15] ..................................................K...........
clfA_012[10] ..........................................S.......K...........
clfA_005[5]  ..............................K.....................D.K
clfA_022[5]  ..............................K.....................D.K
clfA_003[4]  ..................................................................
clfA_009[4]  ..K...............................................................
clfA_013[3]  ..................................................................D.K
clfA_014[3]  ..................................................................
clfA_015[3]  ............N.................K.....................D.K
clfA_006[2]  ............N.........S....P.T.....................D.K
clfA_007[2]  ..................................................D.K
clfA_008[2]  ..................................................D.K
clfA_010[2]  ..........................................V.....................
clfA_017[2]  ..................L.....................D.K
clfA_011[1]  ..................................................................
clfA_016[1]  ..................L.....................D.K
clfA_018[1]  ..................................................................
clfA_019[1]  ..................................................D.K
clfA_020[1]  ............N.................K.....................D.K
clfA_021[1]  ..................................................................
clfA_023[1]  ....................S....P.....................D..
clfA_024[1]  ..................................................K...........
```

FIGURE 8C ClfA align 3/5

```
                        250        260        270        280        290        300
                    ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
clfA_001[22]  VGIDSGTTVYPHQAGYVKLNYGFSVPNSAVKGDTFKITVPKELNLNGVTSTAKVPPIMAG
clfA_002[19]  .T.....................................................................
clfA_004[15]  ......D.....................E..Q.....................................
clfA_012[10]  ......D.....................................................................
clfA_005[5]   .T.....................................................................
clfA_022[5]   .T.....................................................................
clfA_003[4]   .....................................................................
clfA_009[4]   ......D.....................Q.....................................
clfA_013[3]   .T.....................................................................
clfA_014[3]   .....................................................................
clfA_015[3]   .T.....................................................................
clfA_006[2]   .T.....................P.....................................
clfA_007[2]   .T.....................................................................
clfA_008[2]   .T.....................................................................
clfA_010[2]   .....................................................................
clfA_017[2]   .T.....................................................................
clfA_011[1]   .....................................................................
clfA_016[1]   .T.....................................................................
clfA_018[1]   .....................................................................
clfA_019[1]   .T.....................................................................
clfA_020[1]   .T.....................................................A.....
clfA_021[1]   ......D.....................................................................
clfA_023[1]   ...E..D.....................................................................
clfA_024[1]   ......D.....................E..Q.....................................

                        310        320        330        340        350        360
                    ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
clfA_001[22]  DQVLANGVIDSDGNVIYTFTDYVNTKDDVKATLTMPAYLDPENVKKTGNVTLATGIQSTT
clfA_002[19]  .....................DN.EN.T.NI..........T.......T....TN.
clfA_004[15]  .....................................T.....................
clfA_012[10]  .....................D..EN.T.NI..........T.......T.......
clfA_005[5]   .....................DN.EN.T.NI..........T.......T....TN.
clfA_022[5]   .....................DN.EN.T.NI..........T.......T....TN.
clfA_003[4]   ..................................N.....................
clfA_009[4]   ..............................V.....Y.TH..........N..
clfA_013[3]   .....................D..N.....V.........T.......K....TN.
clfA_014[3]   ..........N.....................T.....................
clfA_015[3]   .....................DN.EN.T.NI..........T.......T....TN.
clfA_006[2]   .....................DN.EN.T.NI..........T.......T....TN.
clfA_007[2]   .....................DN.EN.T.NI..........T.......T....TN.
clfA_008[2]   .....................T.....................
clfA_010[2]   .....................................................................
clfA_017[2]   .....................D..EN.T.NI..........T.......T.......
clfA_011[1]   .....................................................................
clfA_016[1]   .....................DN.N.................T.......T.......
clfA_018[1]   .....................T.............N..
clfA_019[1]   .....................DN.N.....V.........T.......T....TN.
clfA_020[1]   .....................DN.EN.T.NI..........T.......T....TN.
clfA_021[1]   .....................T.............N..
clfA_023[1]   ..............................V.....Y.TH..........N..
clfA_024[1]   .....................T.....................
```

FIGURE 8D ClfA align 4/5

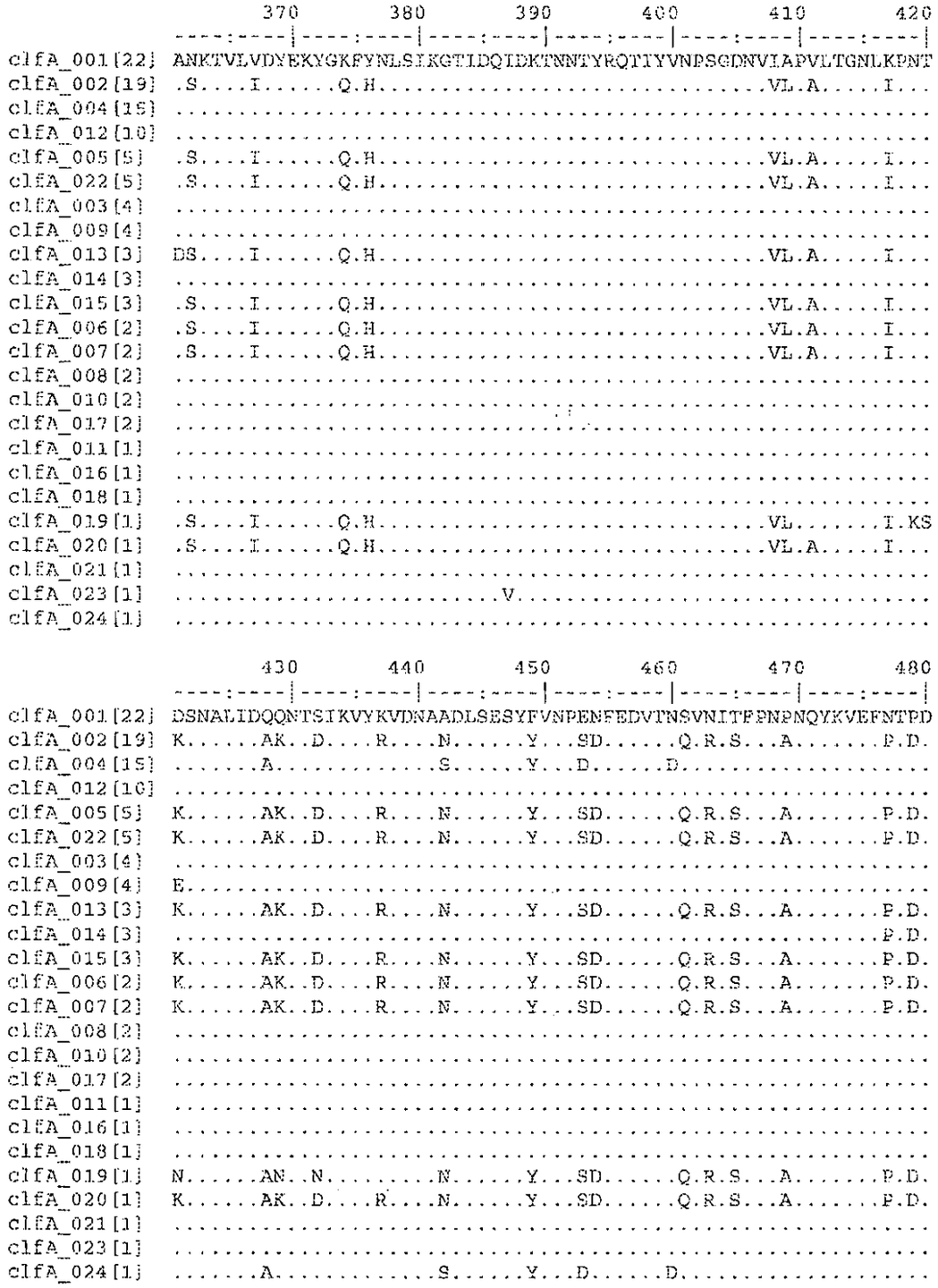


FIGURE 8E ClfA align 5/5

```
                  490       500       510       520       530       540
                  ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
clfA_001[22]  DQITTPYIVVVNGHIDPNSKGDLALRSTLYGYNSNIIWRSMSWDNEVAFNNGSGSGDGTD
clfA_002[19]  ..................A.T........F...D..F.........................
clfA_004[15]  ..................................................................
clfA_012[10]  ..............................D.RFV.............................
clfA_005[5]   ..................A.T........F...D..F.........................
clfA_022[5]   ..................A.T........F...D..F.........................
clfA_003[4]   ..................................................................
clfA_009[4]   ..................................................................
clfA_013[3]   ..................A.T........F...D..F.........................
clfA_014[3]   ..................................................................
clfA_015[3]   ..................A.T........F...D..F.........................
clfA_006[2]   ..................A.T........F...D..F.........................
clfA_007[2]   ..................A.T........F...D..F.........................
clfA_008[2]   ..............................D.RFV.............................
clfA_010[2]   ..................................................................
clfA_017[2]   ..................................................................
clfA_011[1]   ..................................................................
clfA_016[1]   ..................................................................
clfA_018[1]   ..................................................................
clfA_019[1]   ..................A.T........F...D..F.........................
clfA_020[1]   ..................A.T........F...D..F.........................
clfA_021[1]   ..............................D.RFV.............................
clfA_023[1]   ..................................................................
clfA_024[1]   ..........................................................F.....

                  550       560       570       580       590       600
                  ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
clfA_001[22]  KPVVPEQPDEPGEIEPIPE
clfA_002[19]  ...................
clfA_004[15]  ...................
clfA_012[10]  ...................
clfA_005[5]   ...................
clfA_022[5]   ...................
clfA_003[4]   ...................
clfA_009[4]   ...................
clfA_013[3]   ...................
clfA_014[3]   ...................
clfA_015[3]   ...................
clfA_006[2]   ...................
clfA_007[2]   ...................
clfA_008[2]   ...................
clfA_010[2]   ...................
clfA_017[2]   ...................
clfA_011[1]   ...................
clfA_016[1]   ...................
clfA_018[1]   ...................
clfA_019[1]   ...................
clfA_020[1]   ...................
clfA_021[1]   ...................
clfA_023[1]   ...................
clfA_024[1]   ...................
```

FIGURE 9
ClfA Phylogenetic Tree

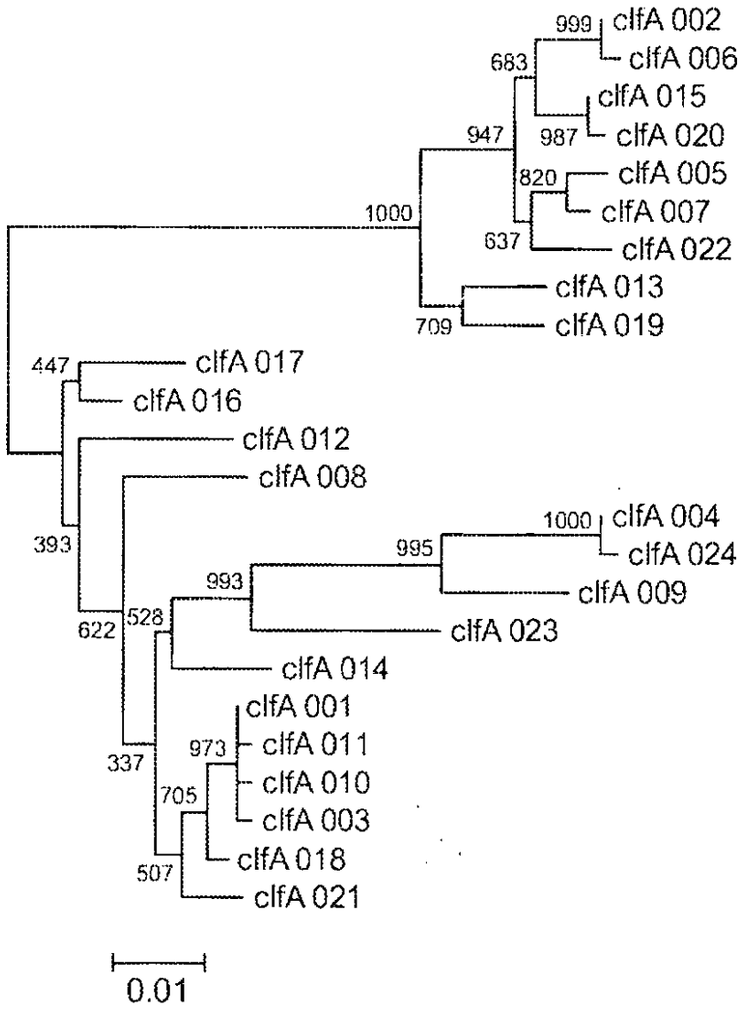


FIGURE 10A ClfB Align 1/5

```
                        10        20        30        40        50        60
                    ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
clfB_006[29]  LKKRIDYLSNKQNKYSIRRFTVGTTSVIVGATILFGIGNHQAQASEQSNDTTQSSKNNAS
clfB_007[12]  ..............................................................
clfB_009[12]  ..............................................................
clfB_002[11]  ..............................................................
clfB_021[4]   ..............................................................
clfB_010[3]   ..............................................................
clfB_011[3]   ..............................................................
clfB_008[2]   ..............................................................
clfB_001[1]   ..............................................................
clfB_003[1]   ..............................................................
clfB_004[1]   ..............................................................
clfB_005[1]   ..............................................................
clfB_013[1]   ..............................................................
clfB_014[1]   ..............................................................
clfB_015[1]   ..........R...................................................
clfB_016[1]   ..............................................................
clfB_017[1]   ..............................................................
clfB_018[1]   ..............................................................
clfB_019[1]   ..............................................................
clfB_020[1]   ..............................................................
clfB_022[1]   ..............................................................
clfB_023[1]   ..............................................................
clfB_024[1]   ..............................................................

                        70        80        90       100       110       120
                    ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
clfB_006[29]  ADSEKNNMIETPQLNTTANDTSDISANTNSANVDSTTKPMSTQTSNTTTTEPASTNETPQ
clfB_007[12]  ..............................................................
clfB_009[12]  ..........................................A...................
clfB_002[11]  .......T..................................A.T.................
clfB_021[4]   ..........................................A...................
clfB_010[3]   ..........................................A...................
clfB_011[3]   ..........................................A...................
clfB_008[2]   ..........................................A...................
clfB_001[1]   .......T..................................A..................H
clfB_003[1]   .......T..................................A...................
clfB_004[1]   .......T..................................A...................
clfB_005[1]   .......T........--........................A...................
clfB_013[1]   ..............................................................
clfB_014[1]   ..........................................A...................
clfB_015[1]   ..............................................................
clfB_016[1]   ..............................................................
clfB_017[1]   ..........................................A...................
clfB_018[1]   .......T..................................A...................
clfB_019[1]   ..........................................A...................
clfB_020[1]   ..........................................A...................
clfB_022[1]   ..........................................A...................
clfB_023[1]   .......T..................................A.T.................
clfB_024[1]   ..............................................................
```

FIGURE 10B ClfB Align 2/5

```
                 130       140       150       160       170       180
                 ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
clfB_006[29] PTAIKNQATAAKMQDQTVPQEANSQVDNKTTNDANSIATNSELKNSQTLDLPQSSPQTIS
clfB_007[12] ..................................................................
clfB_009[12] L....D.....................................P.....................
clfB_002[11] .....D.....................................N.....P.....................
clfB_021[4]  .....D.....................................N.....P.....................
clfB_010[3]  L....D.....................................P.....................
clfB_011[3]  .....D.....................................P.....................
clfB_008[2]  .....D.....................................P.....................
clfB_001[1]  .....D.....................................P.....................
clfB_003[1]  .....D.....................................P.S...................
clfB_004[1]  .....D.....R.....................T.....P.....................
clfB_005[1]  .....D.....R.....................T.....P.....................
clfB_013[1]  .....D.....................................P.....................
clfB_014[1]  .....D.....................................P.....................
clfB_015[1]  ..................................................................
clfB_016[1]  ..........................................T.....................
clfB_017[1]  .....D.....................................C....P.....................
clfB_018[1]  .....D.....................................P.....................
clfB_019[1]  .....D.....................................P.....................
clfB_020[1]  .....D.....................................N.....G...P.....................
clfB_022[1]  .....D.....................................P.....................
clfB_023[1]  .....D.....................................N.....P.....................
clfB_024[1]  ..................................................................

                 190       200       210       220       230       240
                 ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
clfB_006[29] NAQGTSKPSVRTPAVRSLAVAEPVVNAADAKGTNVNDKVTASNFKLEKTTFDPNQSGNTF
clfB_007[12] ..................................................................
clfB_009[12] ..........................................KD.Q.....................
clfB_002[11] ..........................................D......A.....................
clfB_021[4]  ..........................................D.....................
clfB_010[3]  ..........................................KD.Q.....................
clfB_011[3]  ..........................................LQ.Q.....................
clfB_008[2]  ...R.....................................GQ....D.....................
clfB_001[1]  ..................T.....................GQ....D.....................
clfB_003[1]  ..........................................KD.Q.....................
clfB_004[1]  ..........................................KD.Q.....................
clfB_005[1]  ..........................................KD.Q.....................
clfB_013[1]  ..........................................KD.Q.....................
clfB_014[1]  .....................................GQ....D.....................
clfB_015[1]  ..................................................................
clfB_016[1]  ..................................................................
clfB_017[1]  ..........................................KD.Q.....................
clfB_018[1]  ......E...................................D.....................
clfB_019[1]  ...R......................................LQ.Q.....................
clfB_020[1]  ..........................................D.....................
clfB_022[1]  ..........................................KD.Q.....................
clfB_023[1]  ..........................................DL.....A.....................
clfB_024[1]  ...............................D ..................................
```

FIGURE 10C ClfB Align 3/5

```
                    250        260        270        280        290        300
                    ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
clfB_006[29]  MAANFTVIDKVKSGDYFTAKLPDSLTGNGDVDYSNSNNTMPIADIKSTNGDVVAKATYDI
clfB_007[12]  ..........................................................
clfB_009[12]  ........GQ.............V.....................VNDKNE.........
clfB_002[11]  .....K..GQ.............V.....................................
clfB_021[4]   ..........................................................T...N.
clfB_010[3]   ........GQ.............V.....................................
clfB_011[3]   ..........................................................
clfB_008[2]   ..V..K.AG.......Y.....................................................
clfB_001[1]   .....K.AG..............V.....................................
clfB_003[1]   ........GQ.............V.....................VNDKNE.........
clfB_004[1]   ........GQ............E.............................N.........
clfB_005[1]   ........GQ............E.............................N.........
clfB_013[1]   ........GQ.............V.....................................
clfB_014[1]   ...K....GQ..A..........VN.....................................
clfB_015[1]   ..........................................................
clfB_016[1]   ..........................................................
clfB_017[1]   ........GQ.............V.....................................
clfB_018[1]   .....K.AG..............V.....................VNDKKE.........
clfB_019[1]   ..........................................................
clfB_020[1]   ..........................................................T...N.
clfB_022[1]   ........GQ.............V.....................................
clfB_023[1]   .....K..GQ.............V.....................................
clfB_024[1]   ..........................................................

                    310        320        330        340        350        360
                    ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
clfB_006[29]  LTKTYTFVFTDYVNNKENINGQFSLPLFTDRAKAPKSGTYDANINIADEMFNNKITYNYS
clfB_007[12]  ..........................................................
clfB_009[12]  ..............D.Q....K.....................................
clfB_002[11]  ..............D.....................................D.........
clfB_021[4]   ..............D.....................................
clfB_010[3]   ..............E.....................................D.........
clfB_011[3]   ..............D.....................................
clfB_008[2]   ..............D.....................................
clfB_001[1]   ..............D.....................................
clfB_003[1]   ..............D.Q....K.............I.....................
clfB_004[1]   ..............D.....................................
clfB_005[1]   ..............D.....................................
clfB_013[1]   ..............E.....................................D.........
clfB_014[1]   ..........................................................
clfB_015[1]   ..........................................................
clfB_016[1]   ..........................................................
clfB_017[1]   ..........................................................
clfB_018[1]   ..............D.....................................Q.......
clfB_019[1]   ..............D.....................................
clfB_020[1]   ..............D.....................................
clfB_022[1]   ..........................................................
clfB_023[1]   ..............D.....................................D.........
clfB_024[1]   ..........................................................
```

FIGURE 10D ClfB Align 4/5

```
                370        380        390        400        410        420
               ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
clfB_006[29] SPIAGIDKPNGANISSQIIGVDYTASGQNTYKQTVFVNPKQRVLGNTWVYIKGYQDKIEES
clfB_007[12] ..............................................................
clfB_009[12] ..............................................................
clfB_002[11] ..............................................................
clfB_021[4]  ..............................................................
clfB_010[3]  ..............................................................
clfB_011[3]  ..............................................................
clfB_008[2]  ..............................................................
clfB_001[1]  ..............................................................
clfB_003[1]  ..............................................................
clfB_004[1]  ..............................................................
clfB_005[1]  ..............................................................
clfB_013[1]  ..............................................................
clfB_014[1]  ..................................Y...........................
clfB_015[1]  ..............................................................
clfB_016[1]  ..............................................................
clfB_017[1]  ..............................................................
clfB_018[1]  ..............................................................
clfB_019[1]  ..............................................................
clfB_020[1]  ..............................................................
clfB_022[1]  ..............................................................
clfB_023[1]  ..............................................................
clfB_024[1]  ..............................................................

                430        440        450        460        470        480
               ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
clfB_006[29] SGKVSATDTKLRIFEVNDTSKLSDSYYADPNDSNLKEVTDQFKNRIYYEHPNVASIKFGD
clfB_007[12] ................I.............................................
clfB_009[12] ..............................................DK.T.KYQ.....N...
clfB_002[11] ..............................  ......GE..DK.S.KYD.....N...
clfB_021[4]  ..............................................NE..DK.T.KYQ.....N...
clfB_010[3]  ..............................................NE..DK.T.KYQ.....N...
clfB_011[3]  ..............................................DK.T.KYQ.....N...
clfB_008[2]  ..............................................NE..DK.T.KYQ.....N...
clfB_001[1]  ..............................................DK.S.KYD.....N...
clfB_003[1]  ..............................................GE.N...F.........N...
clfB_004[1]  ..............................................DK.T.KYQ.....N...
clfB_005[1]  ..............................................DK.T.KYQ.....N...
clfB_013[1]  ..............................................NE..DK.T.KYQ.....N...
clfB_014[1]  ..............................................NE..DK.T.KYQ.....N...
clfB_015[1]  ..............................................................
clfB_016[1]  ..............................................................
clfB_017[1]  ..............................................NE..DK.T.KYQ.....N...
clfB_018[1]  ..............................................NE..DK.T.KYQ.....N...
clfB_019[1]  ......K.......................................................N...
clfB_020[1]  ..............................................NE..DK.T.KYQ.....N...
clfB_022[1]  ..............................................NE..DK.T.KYQ.....N...
clfB_023[1]  ..............................................GE..DK.S.KYD.....N...
clfB_024[1]  ..............................................................
```

FIGURE 10E ClfB Align 5/5

```
                  490        500        510        520        530        540
                  ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
clfB_006[29]  ITKTYVVLVEGHYDNTGKNLKTQVIQENVDPVTNEDYSIFGWNNENVVRYGGGSADGDSAVN
clfB_007[12]  ..........................................................
clfB_009[12]  .N.........K.............A.GK..........................
clfB_002[11]  .N.......................I..A.GK..........................
clfB_021[4]   .........................I..A.GK..........................
clfB_010[3]   .........................I..A.GK..........................
clfB_011[3]   .N......................I..A.GK..........................
clfB_008[2]   .........................I..A.GK..........................
clfB_001[1]   .N......................I..A.GK..........................
clfB_003[1]   .N......................I..A.GK..........................
clfB_004[1]   .........................I..A.GK..........................
clfB_005[1]   .........................I..A.GK..........................
clfB_013[1]   .........................I..A.GK..........................
clfB_014[1]   .........................I..A.GK..........................
clfB_015[1]   ..........................................................
clfB_016[1]   ..........................................................
clfB_017[1]   .........................I..A.GK..........................
clfB_018[1]   .N......................I..A.GK..........................
clfB_019[1]   .........................I..A.GK..........................
clfB_020[1]   .........................I..A.GK..........................
clfB_022[1]   .........................I..A.GK..........................
clfB_023[1]   .N......................I.SA.GK..........................
clfB_024[1]   ..........................................................
```

FIGURE 11

ClfB PhylogeneticTree

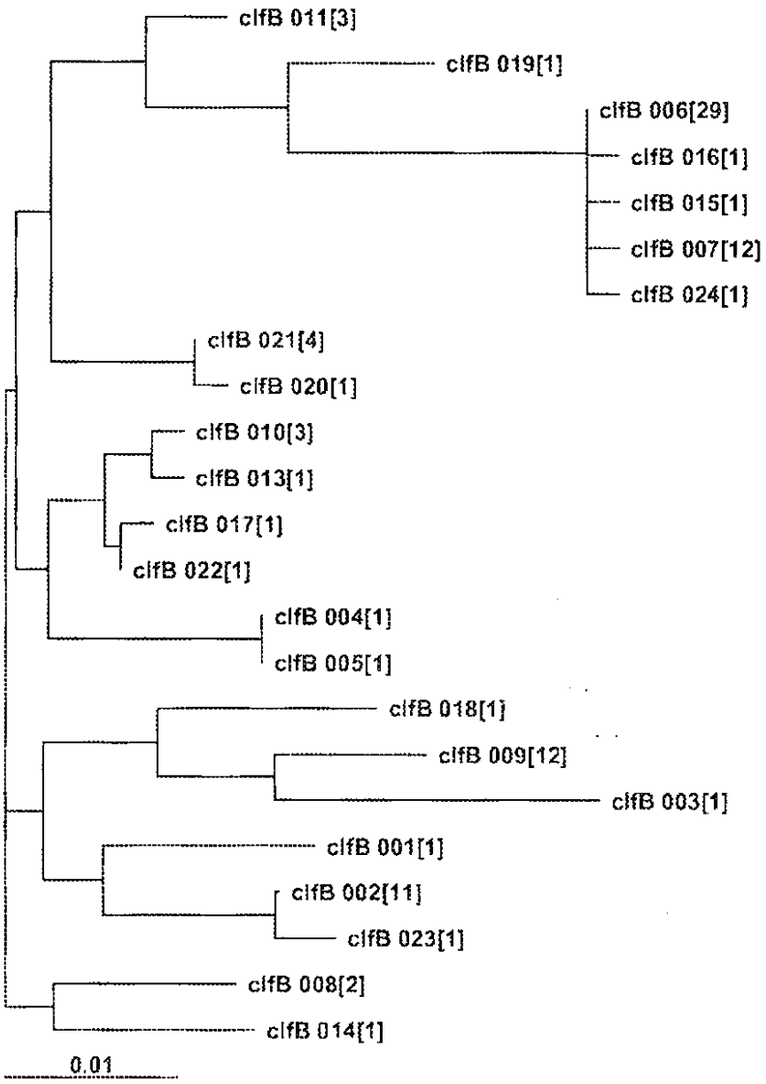


FIGURE 12 MntC Alignment

```
                10        20        30        40        50        60
           ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
305_001[94] MKKLVPLLLALLLLVAACGTGGKQSSDKSNGKLKVVTTNSILYDMAKNVGGDNVDIHSIV
305_006[3]  ............................................................
305_007[3]  ..................D.........................................
305_002[2]  ............................................................
305_003[2]  ............................................................
305_009[1]  ............................................................
305_008[1]  ............................................................

                70        80        90        100       110       120
           ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
305_001[94] PVGQDPHEYEVKPKDIKKLTDADVLLYNGLNLETGNGWFEKALEQAGKSLKDKKVIAVSK
305_006[3]  ............................................................
305_007[3]  ............................................................
305_002[2]  .......................I....................................
305_003[2]  ............................................................
305_009[1]  ............................................................
305_008[1]  ............................................................

                130       140       150       160       170       180
           ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
305_001[94] DVKPIYLNGEEGNKDKQDPHAWLSLDNGIKYVKTIQQTFIDNDKKHKADYEKQGNKYIAQ
305_006[3]  ............................................................
305_007[3]  ............................................................
305_002[2]  ............................................................
305_003[2]  ............................................................
305_009[1]  ............................................................
305_008[1]  ...........................................................Y....

                190       200       210       220       230       240
           ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
305_001[94] LEKLNNDSKD---KFNDIPKEQRAMITSEGAFKYFSKQYGITPGYIWEINTEKQGTPEQM
305_006[3]  ..........---...................................................
305_007[3]  ..........---...................................................
305_002[2]  ..........---...................................................
305_003[2]  ..........SKD...................................................
305_009[1]  ..........---....X..............................................
305_008[1]  ..........---...................................................

                250       260       270       280       290       300
           ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
305_001[94] RQAIEFVKKHKLKHLLVETSVDKKAMESLSEETKKDIFGEVYTDSIGKEGTKGDSYYKMM
305_006[3]  ............................................................
305_007[3]  ............................................................
305_002[2]  ............................................................
305_003[2]  ............................................................
305_009[1]  ............................................................
305_008[1]  ............................................................

        310       320       330       340       350       360
           ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
305_001[94] KSNIETVHGSMK
305_006[3]  ....D.......
305_007[3]  ............
305_002[2]  ............
305_003[2]  ............
305_009[1]  ....D.......
305_008[1]  ....D.......
```

FIGURE 13

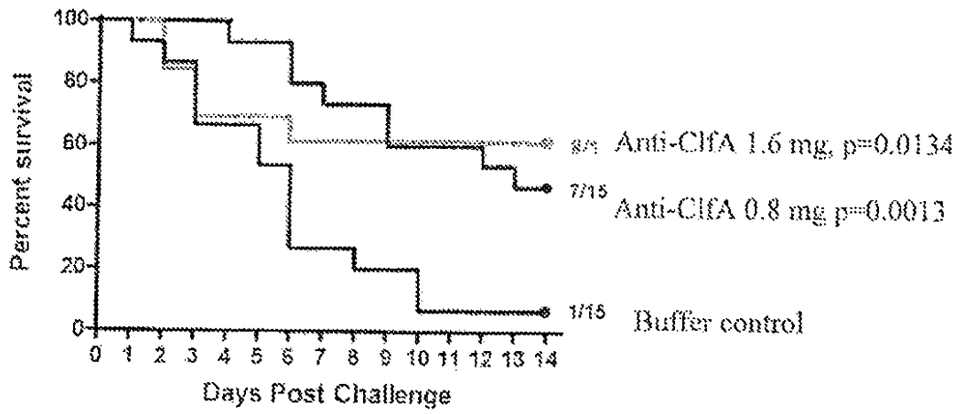

Percent survival
100
80
60
40
20
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
Days Post Challenge
8/15
Anti-ClfA 1.6 mg, p=0.0134
7/15
Anti-ClfA 0.8 mg p=0.0013
1/15
Buffer control

FIGURE 14

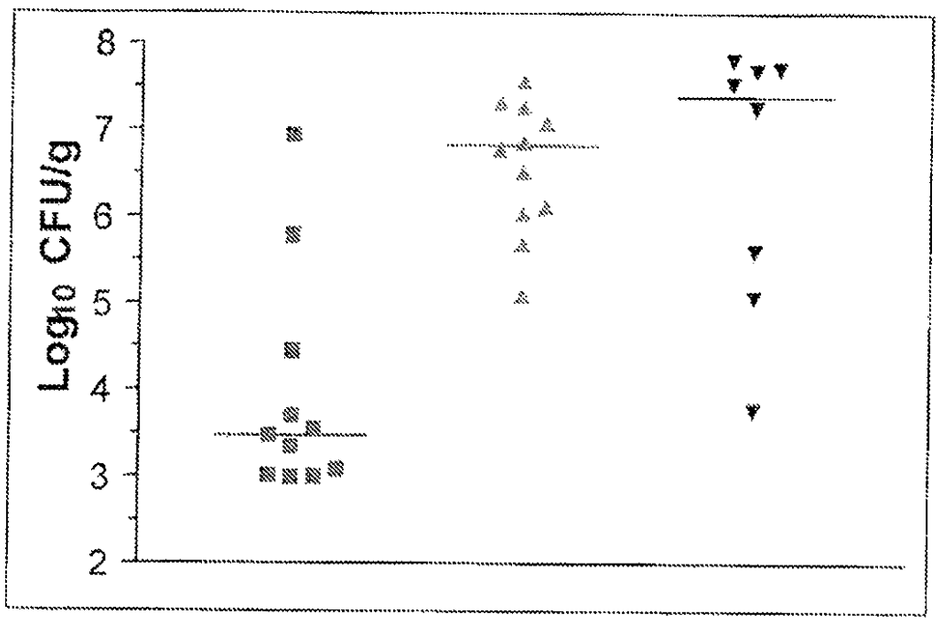
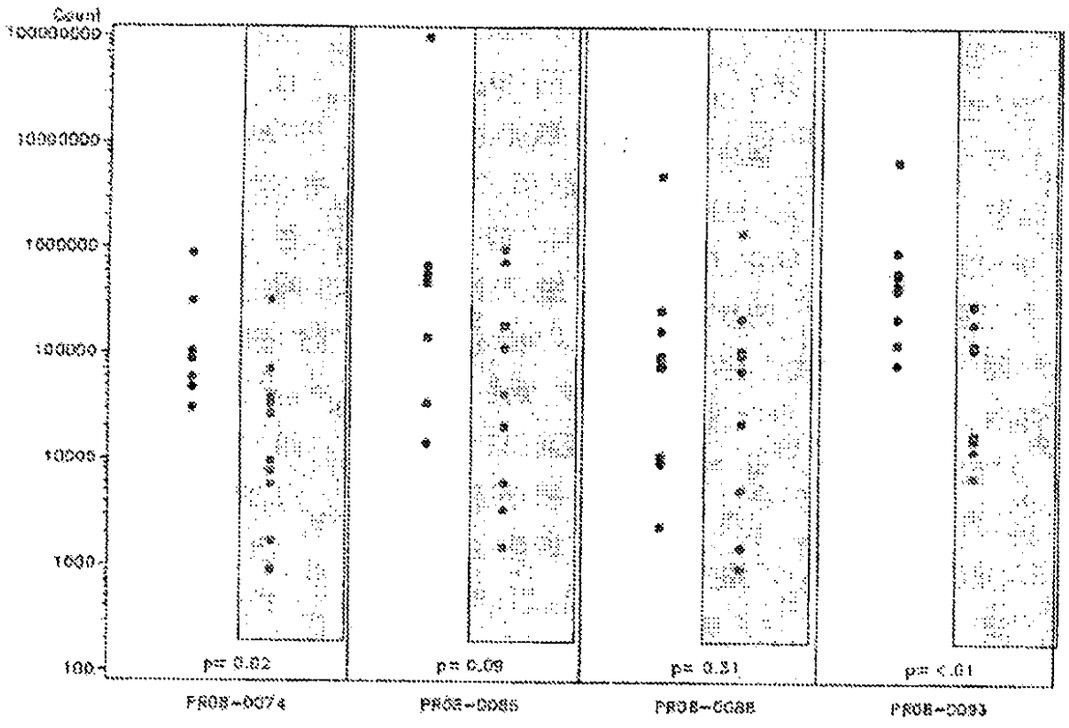


FIGURE 15A

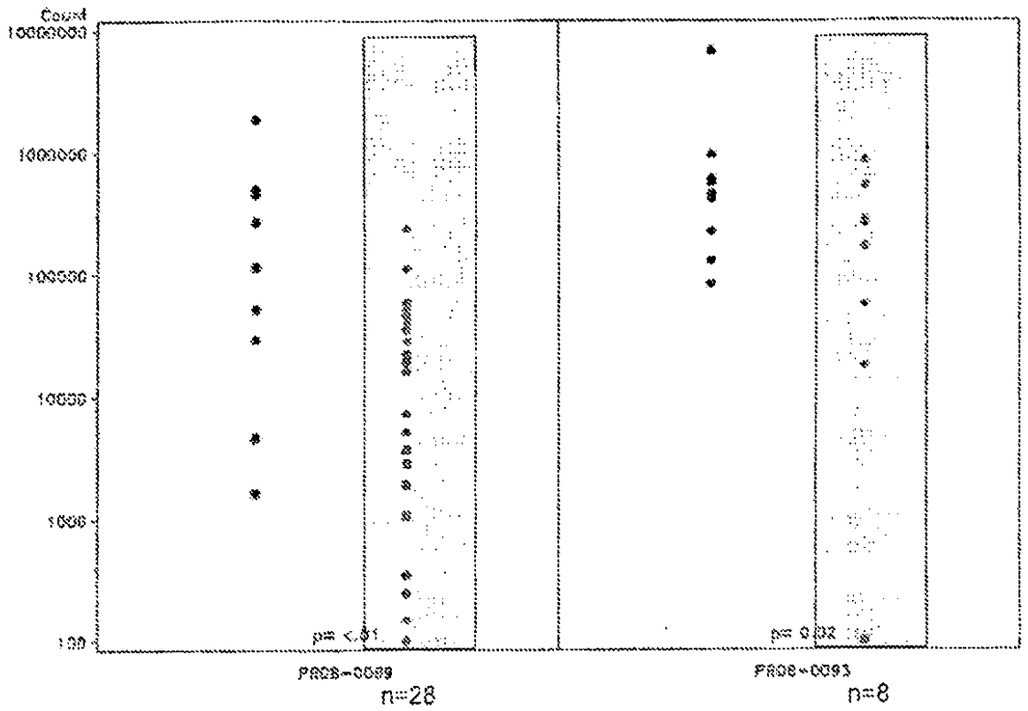


n=10 n=9 n=9 n=8

Meta analysis p= 0.0001

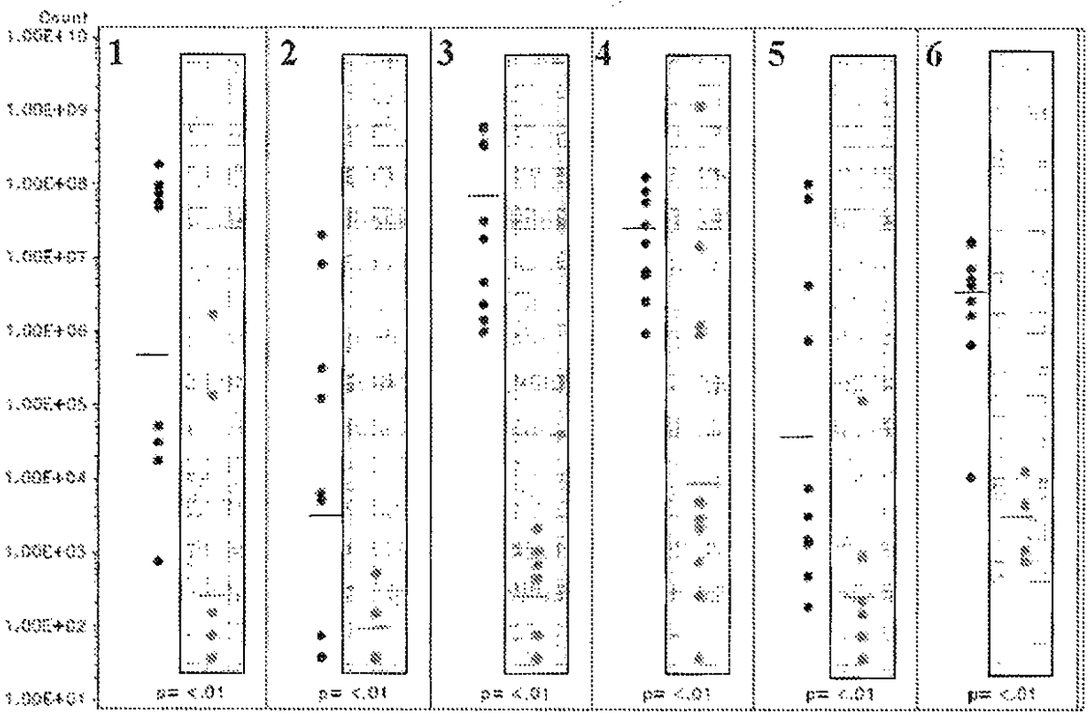
Shaded area is the MntC immunized group.

FIGURE 15B



Meta analysis p= < 0.0001
Shaded area is MntC immunized group

FIGURE 16



n=10 n=10 n=10 n=10 n=10 n=4

Meta analysis p= < 0.0001
Shaded area is serotype 5 polysaccharide conjugate-immunized group

FIGURE 17

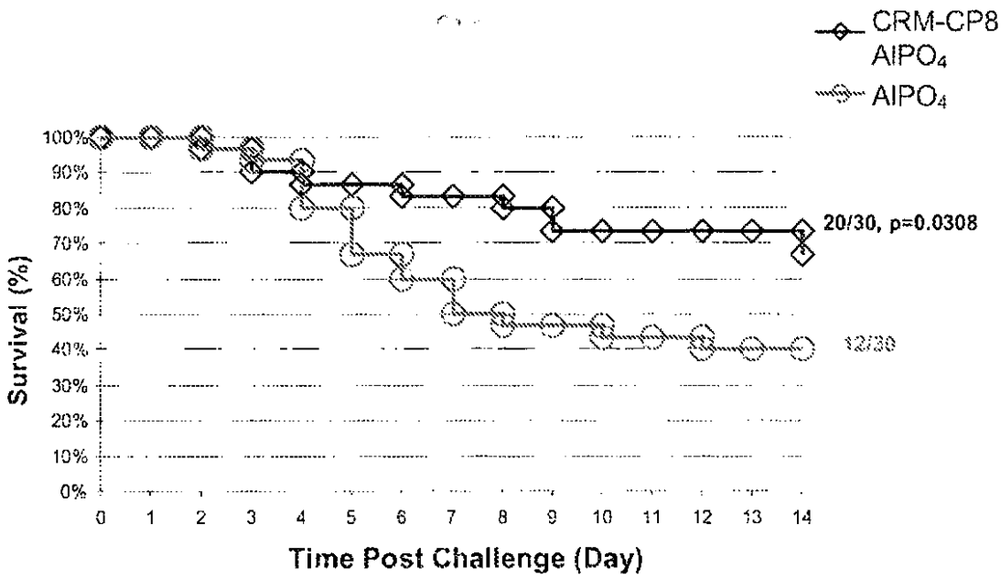

CRM-CP8 AlPO4
AlPO4
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
Survival (%)
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
Time Post Challenge (Day)
20/30, p=0.0308
12/30

FIGURE 18

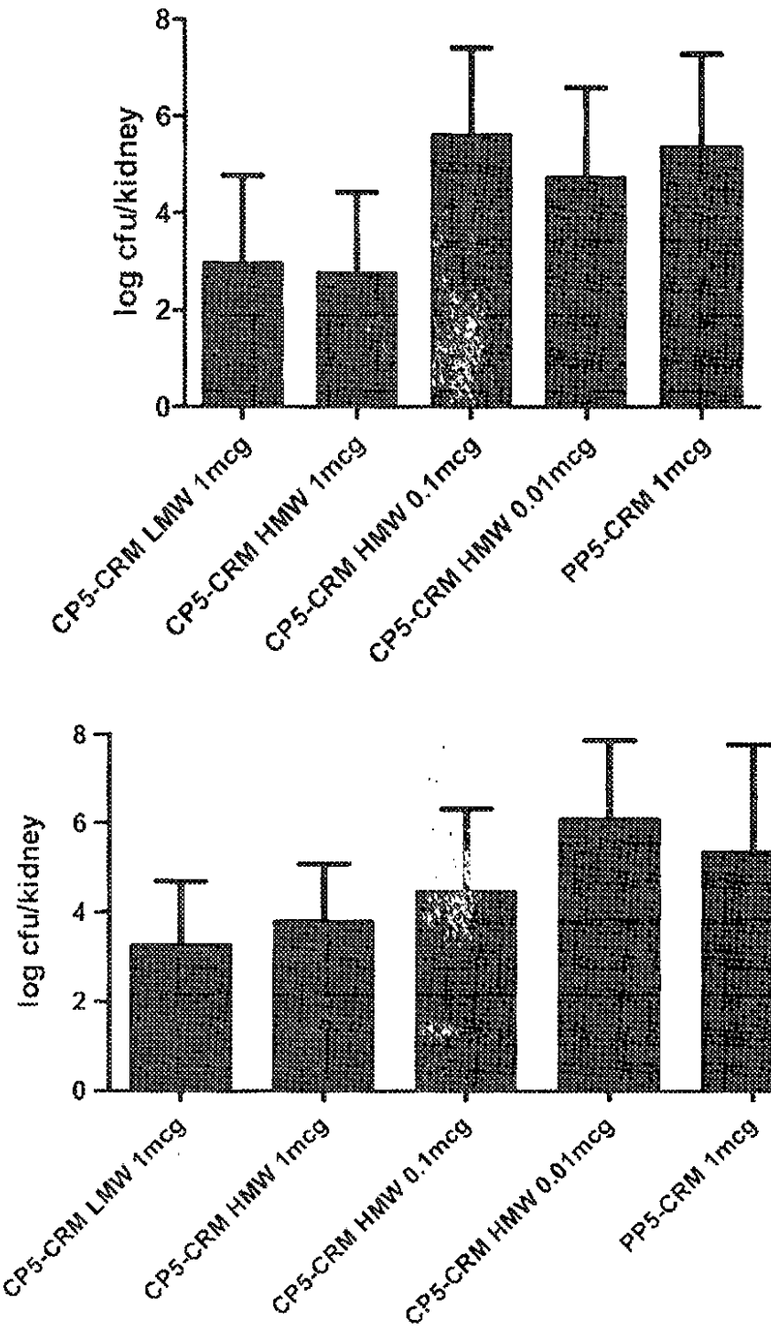

log cfu/kidney
0
2
4
6
8
CP5-CRM LMW 1mcg
CP5-CRM HMW 1mcg
CP5-CRM HMW 0.1mcg
CP5-CRM HMW 0.01mcg
PP5-CRM 1mcg
log cfu/kidney
0
2
4
6
8
CP5-CRM LMW 1mcg
CP5-CRM HMW 1mcg
CP5-CRM HMW 0.1mcg
CP5-CRM HMW 0.01mcg
PP5-CRM 1mcg

FIGURE 19

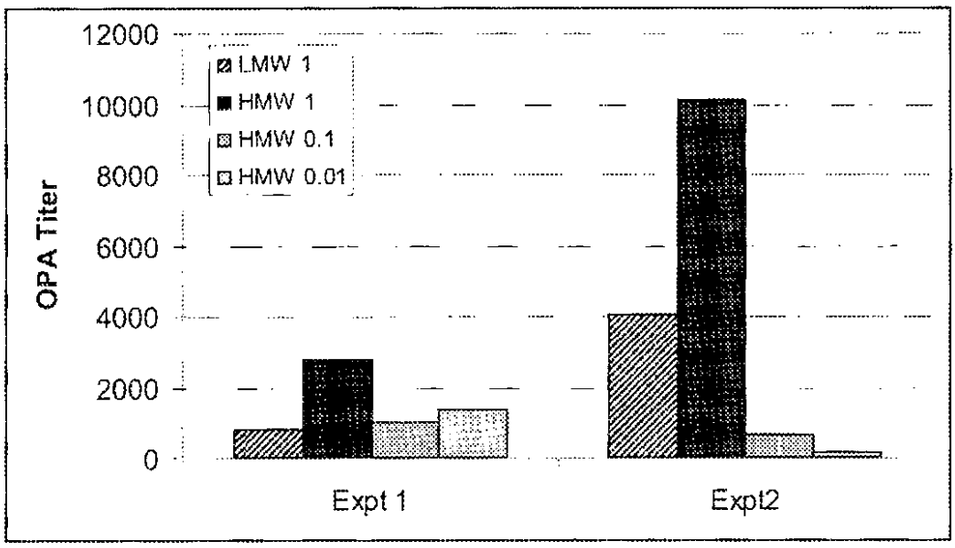
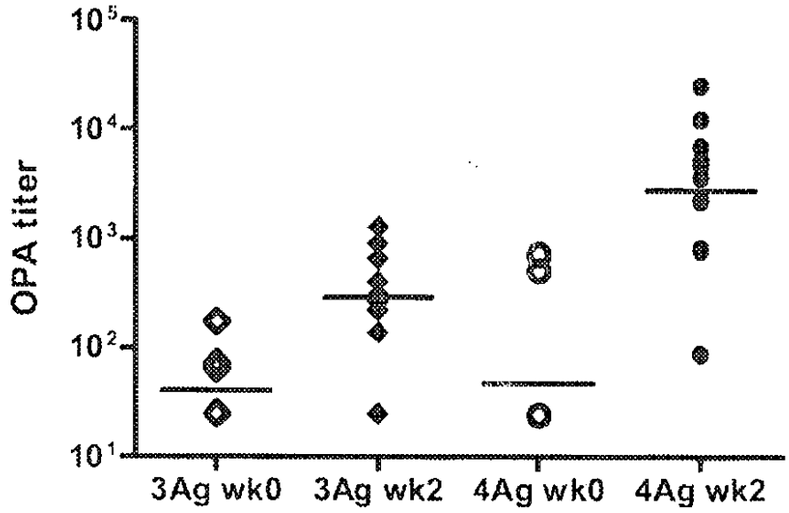

12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
OPA Titer
LMW 1
HMW 1
HMW 0.1
HMW 0.01
Expt 1
Expt2

FIGURE 20



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/039510

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/085
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/113222 A2 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; DENOEL PHILIPPE [BE]; POOLMAN JAN [BE]) 11 October 2007 (2007-10-11)	1-7, 12-30, 32-49, 54-90
Y	The whole document, in particular p.29, li.17-37claims 1,2,9,12; example 2	8-11,31, 50-53

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
17 August 2010	27/08/2010

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Chapman, Rob

92

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/039510

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DEIVANAYAGAM C C S ET AL: "A novel variant of the immunoglobulin fold in surface adhesins of Staphylococcus aureus: Crystal structure of the fibrinogen-binding MSCRAMM, clumping factor A" EMBO JOURNAL, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB LNKD- DOI:10.1093/EMBOJ/CDF619, vol. 21, no. 24, 16 December 2002 (2002-12-16), pages 6660-6672, XP002523689 ISSN: 0261-4189 the whole document	8-11,31, 50-53
A	NANRA J S ET AL: "Heterogeneous in vivo expression of clumping factor A and capsular polysaccharide by Staphylococcus aureus: Implications for vaccine design" VACCINE, ELSEVIER LTD, GB LNKD- DOI:10.1016/J.VACCINE.2009.01.062, vol. 27, no. 25-26, 26 May 2009 (2009-05-26), pages 3276-3280, XP026122449 ISSN: 0264-410X [retrieved on 2009-02-05] the whole document	1-90
A	JONES C: "Revised structures for the capsular polysaccharides from Staphylococcus aureus Types 5 and 8, components of novel glycoconjugate vaccines" CARBOHYDRATE RESEARCH, PERGAMON, GB LNKD- DOI:10.1016/J.CARRES.2005.02.001, vol. 340, no. 6, 2 May 2005 (2005-05-02), pages 1097-1106, XP004818368 ISSN: 0008-6215 the whole document	1-90
X	WO 2007/113223 A2 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL [US]; BIEMAN) 11 October 2007 (2007-10-11)	1-7, 12-30, 32-49, 54-90
Y	the whole document	8-11,31, 50-53
X	WO 2006/032472 A2 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; CASTADO CINDY [BE]; LECRENIER NICOLAS) 30 March 2006 (2006-03-30)	1-7, 12-30, 32-49, 54-90
Y	the whole document	8-11,31, 50-53

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/039510

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2007/087014 A1 (PAVLIAK VILIAM [US] ET AL) 19 April 2007 (2007-04-19) the whole document	1-90
A	MAIRA-LITRAN T ET AL: "COMPARATIVE OPSONIC AND PROTECTIVE ACTIVITIES OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS CONJUGATE VACCINES CONTAINING NATIVE OR DEACETYLATED STAPHYLOCOCCAL POLY-N-ACETYL-BETA-(1-6)-GLUCOSAMINE" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US LNKD-DOI:10.1128/IAI.73.10.6752-6762.2005, vol. 73, no. 10, 1 October 2005 (2005-10-01), pages 6752-6762, XP009058830 ISSN: 0019-9567 the whole document	1-90
A	COCKAYNE ALAN ET AL: "Molecular cloning of a 32-kilodalton lipoprotein component of a novel iron-regulated Staphylococcus epidermis ABC transporter" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, vol. 66, no. 8, 1 August 1998 (1998-08-01) , pages 3767-3774, XP002205876 ISSN: 0019-9567 the whole document	1-90
A	FATTOM A I ET AL: "Antigenic determinants of Staphylococcus aureus type 5 and type 8 capsular polysaccharide vaccines" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, vol. 66, no. 10, 1 October 1998 (1998-10-01), pages 4588-4592, XP002153789 ISSN: 0019-9567 the whole document	1-90
A	BHASIN NAVNEET ET AL: "Identification of a gene essential for O-acetylation of the Staphylococcus aureus type 5 capsular polysaccharide" MOLECULAR MICROBIOLOGY, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING LTD, GB LNKD-DOI:10.1046/J.1365-2958.1998.00646.X, vol. 27, no. 1, 1 January 1998 (1998-01-01), pages 9-21, XP002452587 ISSN: 0950-382X the whole document	1-90

-/--

92

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/039510

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SCHINEFIELD H ET AL: "Use of staphylococcus aureus conjugate vaccine in patients receiving hemodialysis" NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, THE, MASSACHUSETTS MEDICAL SOCIETY, WALTHAM, MA, US LNKD- DOI:10.1056/NEJMOA011297, vol. 346, no. 7, 14 February 2002 (2002-02-14), pages 491-496, XP002967410 ISSN: 0028-4793 the whole document	1-90

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2010/039510

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007113222 A2	11-10-2007	AU 2007233705 A1	11-10-2007
		CA 2647441 A1	11-10-2007
		EA 200801839 A1	28-08-2009
		EP 1998802 A2	10-12-2008
		JP 2009531387 T	03-09-2009
		KR 20080111115 A	22-12-2008
		US 2010021503 A1	28-01-2010
WO 2007113223 A2	11-10-2007	AR 060187 A1	28-05-2008
		AR 060188 A1	28-05-2008
		CA 2647450 A1	11-10-2007
		CA 2647455 A1	11-10-2007
		EP 2019689 A2	04-02-2009
		EP 2026841 A2	25-02-2009
		WO 2007113224 A2	11-10-2007
		JP 2009531388 T	03-09-2009
		JP 2009531389 T	03-09-2009
WO 2006032472 A2	30-03-2006	AU 2005287502 A1	30-03-2006
		AU 2005287505 A1	30-03-2006
		AU 2005287532 A1	30-03-2006
		BR PI0515516 A	29-07-2008
		BR PI0515520 A	29-07-2008
		CA 2580103 A1	30-03-2006
		CA 2580137 A1	30-03-2006
		CA 2584290 A1	30-03-2006
		EP 1793849 A2	13-06-2007
		EP 1804833 A2	11-07-2007
		EP 1791559 A2	06-06-2007
		EP 2181714 A2	05-05-2010
		WO 2006032475 A2	30-03-2006
		WO 2006032500 A2	30-03-2006
		JP 2008513406 T	01-05-2008
		JP 2008513409 T	01-05-2008
		KR 20070054732 A	29-05-2007
		KR 20070058631 A	08-06-2007
		NZ 553775 A	28-05-2010
		NZ 553776 A	28-05-2010
		US 2008095777 A1	24-04-2008
		US 2008085289 A1	10-04-2008
US 2007087014 A1	19-04-2007	NONE	

COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS DE ANTÍGENOS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS

REFERENCIA CRUZADA A LAS SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] La presente solicitud reivindica el beneficio de la prioridad de la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos con n.° 61/219.134, presentada el 22 de junio de 2009, la totalidad de la cual se incorpora por la presente por referencia en el presente documento.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0002] La presente invención se refiere a composiciones inmunogénicas, que comprenden polipéptidos y polisacáridos capsulares aislados a partir de Staphylococcus aureus. Además, la invención se refiere a unos procedimientos de inducción de una respuesta inmunitaria en sujetos frente a Staphylococcus aureus usando composiciones inmunogénicas de los polisacáridos y polipéptidos capsulares de Staphylococcus aureus. Los anticuerpos resultantes pueden usarse también para tratar o evitar una infección por Staphylococcus aureus a través de inmunoterapia pasiva.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0003] Los seres humanos son los depósitos naturales para Staphylococcus aureus (S. aureus). Los individuos sanos pueden ser colonizados mediante S. aureus en la piel, en las fosas nasales y la garganta o bien de forma persistente (de un 10 a un 35 %), intermitente (de un 20 a un 75 %) o bien estar en un estado de no portador (de un 5 a un 70 %) sin enfermedad asociada alguna. Véase Vandenbergh y col., J. Clin. Micro. 37:3133 a 3140 (1999). Posteriormente tiene lugar la enfermedad cuando los individuos están inmunocomprometidos debido a brechas en las barreras inmunitarias,

tal como durante la cirugía, colocación de catéteres permanentes u otros dispositivos, traumatismo, o heridas. La infección resultante por S. aureus puede dar lugar a una amplia gama de enfermedades diferentes que varían entre infecciones de la piel leves y endocarditis, osteomielitis, bacteriemia, septicemia, y otras formas de enfermedad con unas altas tasas de mortalidad asociadas. El gran depósito humano aumenta la oportunidad de evolución y propagación de tipos de clonación patogénicos adaptados.

[0004] Las infecciones estafilocócicas invasivas a partir de cocos Gram positivos S. aureus y S. epidermidis son de particular interés debido a que éstas se están convirtiendo en un creciente problema de salud pública a nivel mundial. Específicamente, S. aureus es responsable de la mayoría de infecciones adquiridas en hospital (nosocomiales) y su prevalencia en infecciones de aparición en la comunidad va en aumento. Por ejemplo, la incidencia de S. aureus (MRSA) resistente a meticilina invasivo se estimó en 31,8 por 100.000 personas, incluyendo 18.650 muertes en los Estados Unidos en 2005. Véase Klevens R.M. y col., JAMA, 298:1763 a 71 (2007).

[0005] Las enfermedades estafilocócicas han experimentado un aumento drástico en los últimos 20 años, este aumento corre parejo con el uso de dispositivos intravasculares y de procedimientos invasivos. Este aumento en incidencia de enfermedad se hace más preocupante debido al aumento paralelo de resistencia a antibióticos, por lo tanto, hay una necesidad urgente de composiciones inmunogénicas para su uso en vacunas o para provocar que anticuerpos policlonales o monoclonales confieran inmunidad pasiva como un medio de evitar o de tratar una infección por estafilococos y enfermedades asociadas.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

[0006] La presente invención se dirige hacia una composición inmunogénica multiantígeno o multicomponente que comprende al menos tres antígenos aislados a partir de una bacteria estafilocócica. Los antígenos, que son polipéptidos y polisacáridos, pueden obtenerse, entre otros, directamente a partir de la bacteria usando unos procedimientos de aislamiento conocidos por los expertos en la técnica, o éstos pueden producirse usando protocolos de síntesis, o éstos pueden producirse de forma recombinante usando unos procedimientos de ingeniería genética también conocidos por los expertos en la técnica, o a través de una combinación de cualquiera de los anteriores. En ciertas realizaciones, una composición inmunogénica de la invención comprende tres o más antígenos que se seleccionan de un polipéptido de factor de aglutinación A (ClfA) de S. aureus aislado, un polipéptido de factor de aglutinación B (ClfB) de S. aureus aislado, un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 5 (CP5) conjugado con una proteína de portador, un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 8 (CP8) conjugado con una proteína de portador y una proteína MntC de S. aureus aislada. Además, la presente invención proporciona procedimientos para inducir una respuesta inmunitaria frente a una bacteria estafilocócica, procedimientos para prevenir, para reducir la gravedad, o para retardar la aparición de una enfermedad causada por una bacteria estafilocócica, y procedimientos para prevenir, para reducir la gravedad, o para retardar la aparición de al menos un síntoma de una enfermedad causada por infección con una bacteria estafilocócica.

[0007] Por consiguiente, en una realización, la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende: un polipéptido de factor de aglutinación A (ClfA) de S. aureus aislado, un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 5 (CP5) conjugado con una proteína de portador, y un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 8 (CP8) conjugado con una proteína de portador.

[0008] En una realización, la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende: un polipéptido de factor de aglutinación A (ClfA) de S. aureus aislado, un factor de aglutinación B (ClfB) de S. aureus aislado, un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 5 (CP5) conjugado con una proteína de portador, y un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 8 (CP8) conjugado con una proteína de portador.

[0009] En una realización, la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende: un polipéptido de factor de aglutinación A (ClfA) de S. aureus aislado, un polipéptido de factor de aglutinación B (ClfB) de S. aureus aislado, una proteína MntC de S. aureus aislada, un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 5 (CP5) conjugado con una proteína de portador, y un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 8 (CP8) conjugado con una proteína de portador.

[0010] En una realización, la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende: un polipéptido de factor de aglutinación A (ClfA) de S. aureus aislado, una proteína MntC de S. aureus aislada, un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 5 (CP5) conjugado con una proteína de portador, y un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 8 (CP8) conjugado con una proteína de portador.

96

[0011] En una realización, la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende: un polipéptido de factor de aglutinación B (ClfB) de S. aureus aislado, un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 5 (CP5) conjugado con una proteína de portador, y un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 8 (CP8) conjugado con una proteína de portador.

[0012] En una realización, la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende: un polipéptido de factor de aglutinación B (ClfB) de S. aureus aislado, una proteína MntC de S. aureus aislada, un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 5 (CP5) conjugado con una proteína de portador, y un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 8 (CP8) conjugado con una proteína de portador.

[0013] En una realización, la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende: un polipéptido de factor de aglutinación A (ClfA) de S. aureus aislado, un polipéptido de factor de aglutinación B (ClfB) de S. aureus aislado, y una proteína MntC de S. aureus aislada.

[0014] En una realización, la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende: una proteína MntC de S. aureus aislada, un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 5 (CP5) conjugado con una proteína de portador, y un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 8 (CP8) conjugado con una proteína de portador.

[0015] En una realización, la composición inmunogénica comprende un fragmento de polipéptido de ClfA aislado, en la que el fragmento de polipéptido de ClfA comprende el dominio de unión a fibrinógeno de ClfA. En una realización, el fragmento de polipéptido de ClfA comprende un dominio

de unión a fibrinógeno que comprende los dominios de ClfA N1, N2 y N3. En una realización, el fragmento de polipéptido de ClfA comprende un dominio de unión a fibrinógeno que comprende los dominios de ClfA N2 y N3. En una realización, las composiciones con contenido en el dominio de unión a fibrinógeno de ClfA muestran una unión reducida a fibrinógeno. En una realización, el dominio de unión a fibrinógeno de ClfA se une a fibrinógeno a un nivel reducido en comparación con la unión que se observa a fibrinógeno con el dominio de unión a fibrinógeno nativo de ClfA. En una realización, las composiciones con contenido en el dominio de unión a fibrinógeno de ClfA muestran una unión reducida a fibrinógeno y tienen una sustitución de aminoácidos en uno o más de Tyr 338, Tyr 256, Pro 336, Lys 389, Ala 254 y Ile 387 de la longitud total de la proteína con contenido en la secuencia señal. En una realización, las composiciones con contenido en el dominio de unión a fibrinógeno de ClfA muestran una sustitución de aminoácidos en uno o más de Tyr 338, Tyr 256, Pro 336, Lys 389, Ala 254 y Ile 387, en la que el aminoácido en una o más cualesquiera de éstas posiciones se cambia a una Ala o Ser. En una realización, la composición comprende un dominio de unión a fibrinógeno de ClfA en el que la Tyr en la posición 338 se cambia a una Ala.

[0016] En una realización, la composición inmunogénica comprende un fragmento de polipéptido de ClfB aislado, en la que el fragmento de polipéptido de ClfB comprende el dominio de unión a fibrinógeno de ClfB. En una realización, el fragmento de polipéptido de ClfB comprende un dominio de unión a fibrinógeno que comprende los dominios de ClfB N1, N2 y N3. En una realización, el fragmento de polipéptido de ClfB comprende un dominio

de unión a fibrinógeno que comprende los dominios de ClfB N2 y N3. En una realización, las composiciones con contenido en el dominio de unión a fibrinógeno de ClfB muestran una unión reducida a fibrinógeno. En una realización, el dominio de unión a fibrinógeno de ClfB se une a fibrinógeno a un nivel reducido en comparación con la unión que se observa a fibrinógeno con el dominio de unión a fibrinógeno nativo de ClfB.

[0017] En una realización, la composición inmunogénica comprende polisacárido capsular de tipo 5 (CP5) de S. aureus que es un polisacárido de alto peso molecular de entre 20 y 1.000 kDa. En una realización, el polisacárido de alto peso molecular de tipo 5 tiene un peso molecular de entre 50 y 300 kDa. En una realización, el polisacárido de alto peso molecular de tipo 5 tiene un peso molecular de entre 70 y 150 kDa.

[0018] En una realización, la composición inmunogénica comprende un polisacárido capsular de tipo 5 de S. aureus, que está entre un 10 % y un 100 % O-acetilado. En una realización, la composición inmunogénica comprende un polisacárido capsular de tipo 5 de S. aureus, que está entre un 50 % y un 100 % O-acetilado. En una realización, la composición inmunogénica comprende un polisacárido capsular de tipo 5 de S. aureus, que está entre un 75 % y un 100 % O-acetilado.

[0019] En una realización, la composición inmunogénica comprende polisacárido capsular de tipo 8 de S. aureus que es un polisacárido de alto peso molecular de entre 20 y 1.000 kDa. En una realización, el polisacárido de alto peso molecular de tipo 8 tiene un peso molecular de entre 50 y 300 kDa. En una realización, el polisacárido de alto peso molecular de tipo 8 tiene un peso molecular de entre 70 y 150 kDa.

[0020] En una realización, la composición inmunogénica comprende un polisacárido capsular de tipo 8 de S. aureus, que está entre un 10 % y un 100 % O-acetilado. En una realización, la composición inmunogénica comprende un polisacárido capsular de tipo 8 de S. aureus, que está entre un 50 % y un 100 % O-acetilado. En una realización, la composición inmunogénica comprende un polisacárido capsular de tipo 8 de S. aureus, que está entre un 75 % y un 100 % O-acetilado.

[0021] En una realización, el polisacárido capsular 5 y/o 8 presente en una composición inmunogénica está conjugado con una proteína de portador. En una realización, la proteína de portador es el toxoide CRM_{197} de Corynebacterium diphtheriae (C. diphtheriae).

[0022] En una realización, la composición inmunogénica comprende la MntC de S. aureus, que es una proteína lipidada. En una realización, la composición inmunogénica comprende la MntC de S. aureus, que no es una proteína lipidada.

[0023] En una realización, la invención proporciona una composición inmunogénica tal como se describe en el presente documento, que además comprende al menos una proteína a partir de la familia de proteínas de repetición de serina-aspartato (Sdr) que se selecciona del grupo que consiste en SdrC, SdrD y SdrE.

[0024] En una realización, la invención proporciona una composición inmunogénica tal como se describe en el presente documento, que además comprende la proteína de determinante de superficie de hierro B (IsdB).

[0025] En cada una de las realizaciones que se describen en el presente documento en las que una composición inmunogénica comprende tres o

98

más antígenos enumerados, esa composición puede comprender además otras sustancias inmunogénicas y/o no inmunogénicas. En ciertas realizaciones, cada composición inmunogénica puede, alternativamente, "consistir esencialmente en" o "consistir en" los tres o más antígenos enumerados y comprender además una o más sustancias no inmunogénicas, tal como se describe con más detalle en el presente documento.

[0026] En una realización, la invención proporciona una composición inmunogénica tal como se describe en el presente documento, que además comprende uno cualquiera de los siguientes antígenos: Opp3a, DltD, HtsA, LtaS, IsdA, IsdC, SdrF, SdrG, SdrH, SrtA, SpA, Sbi FmtB, alfa-hemolisina (hla), beta-hemolisina, proteína A de unión a fibronectina (fnbA), proteína B de unión a fibronectina (fnbB), coagulasa, Fig, map, leucocidina Panton-Valentine (pvl), alfa-toxina y sus variantes, gamma-toxina (hlg) y variantes, ica, transportador ABC inmunodominante, transportador Mg2+, transportador ABC de Ni, RAP, autolisina, receptores de laminina, IsaA/PisA, IsaB/PisB, SPOIIIE, SsaA, EbpS, Sas A, SasF, SasH, EFB (FIB), SBI, Npase, EBP, sialoproteína II de unión a hueso, precursor de aureolisina (AUR)/Sepp1, Cna, y fragmentos de los mismos tal como M55, TSST-1, mecA, poli-N-acetilglucosamina (PNAG/dPNAG) exopolisacárido, GehD, EbhA, EbhB, SSP-1, SSP-2, HBP, proteína de unión a vitronectina, HarA, EsxA, EsxB, Enterotoxina A, Enterotoxina B, Enterotoxina C1, y autolisina novedosa. En ciertas realizaciones de la invención, cuando la composición inmunogénica comprende ciertas formas de CP5 y/o CP8, puede no comprender además PNAG.

[0027] En una realización, la composición inmunogénica además comprende un adyuvante. En una realización, la composición inmunogénica además comprende un portador farmacéuticamente aceptable.

[0028] En una realización, la composición inmunogénica se usa para formular una vacuna. En una realización, la vacuna se usa para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto frente a S. aureus. En una realización, la composición inmunogénica se usa para generar una formulación de anticuerpo para conferir inmunidad pasiva en un sujeto.

[0029] En una realización, la invención proporciona un procedimiento de inducción de una respuesta inmunitaria frente a S. aureus que comprende la administración a un sujeto de una cantidad inmunogénica de cualquiera de las composiciones inmunogénicas que se describen en el presente documento y un portador farmacéuticamente aceptable.

[0030] En una realización, la invención proporciona un procedimiento de prevención o de reducción de infección con S. aureus, o un procedimiento de prevención o de reducción de la gravedad de al menos un síntoma asociado con una infección causada por S. aureus, comprendiendo los procedimientos la administración a un sujeto de una cantidad inmunogénica de cualquiera de las composiciones inmunogénicas que se describen en el presente documento y un portador farmacéuticamente aceptable.

[0031] En una realización, los procedimientos para inducir una respuesta inmunitaria frente a S. aureus comprenden la administración de las composiciones inmunogénicas con un adyuvante. En una realización, los procedimientos para inducir una respuesta inmunitaria frente a S. aureus

99

prevén la administración de las composiciones inmunogénicas con un portador farmacéuticamente aceptable.

[0032] En una realización, la respuesta inmunitaria inducida mediante las composiciones inmunogénicas que se describen en el presente documento, evita o reduce una enfermedad o afección asociada con un organismo estafilocócico en un sujeto, o evita o reduce uno o más síntomas asociados con un organismo estafilocócico en un sujeto. En una realización, la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en enfermedad invasiva por S. aureus, septicemia y estado de portador.

[0033] En una realización, la respuesta inmunitaria inducida comprende la generación de anticuerpos que tienen una actividad opsonofagocítica (OPA) frente a S. aureus. En una realización, la respuesta inmunitaria inducida comprende la generación de más altos títulos de anticuerpos opsonofagocíticos específicos para S. aureus en comparación con la que se observa en sujetos no inmunizados. En una realización, el título opsonofagocítico es al menos 1:20.

[0034] En una realización, la S. aureus frente a la que se induce la respuesta inmunitaria es MRSA. En una realización, la S. aureus frente a la que se induce la respuesta inmunitaria es MSSA. En una realización, la S. aureus frente a la que se induce la respuesta inmunitaria es VRSA. En una realización, la S. aureus frente a la que se induce la respuesta inmunitaria es VISA.

[0035] En una realización, la invención proporciona un procedimiento de prevención de una infección por estafilococos en un sujeto que se somete a un procedimiento quirúrgico, comprendiendo el procedimiento la

administración de una cantidad inmunológicamente eficaz de cualquiera de las composiciones inmunogénicas tal como se describe en el presente documento al sujeto antes del procedimiento quirúrgico. El procedimiento quirúrgico puede ser un procedimiento quirúrgico opcional o un procedimiento quirúrgico no opcional. En una realización, el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico cardio-torácico. En una realización, el sujeto es un ser humano, un animal doméstico, o un animal de ganado.

[0036] En una realización, la invención proporciona un procedimiento para conferir inmunidad pasiva a un sujeto que comprende las etapas de (1) generar una preparación de anticuerpos usando unas composiciones inmunogénicas de la invención; y (2) administrar la preparación de anticuerpos al sujeto para conferir inmunidad pasiva.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0037] La figura 1 muestra las varias formas de ClfA recombinante y da a conocer SEQ ID n.^{os}: 125 y 127 a 129, respectivamente, en el orden de aparición.

[0038] La figura 2 muestra las etapas de clonación que se usan para la construcción de pLP1179 para expresar el ClfA.

[0039] La figura 3 muestra el vector de expresión de T7ClfA(N123)Y338A, pLP1179.

[0040] La figura 4 muestra la estructura de repetición de los polisacáridos CP5 y CP8.

[0041] Las figuras 5A y 5B muestran unos perfiles de peso molecular de CP5 (A) y CP8 (B) que se producen a unos pH de caldo diferentes.

100

[0042] Las figuras 6A y 6B muestran unos perfiles de peso molecular de CP5 (A) y CP8 (B) que se producen a temperaturas diferentes.

[0043] La figura 7 muestra la correlación del peso molecular de purificado CP5 y CP8 con el tiempo de tratamiento para hidrólisis ácida suave.

[0044] La figura 8A a 8E muestran el alineamiento de ClfA entre varias cepas de S. aureus (SEQ ID n.^{os}: 62, 64, 68, 84, 70, 104, 66, 78, 86, 88, 90, 72, 74, 76, 80, 94, 82, 92, 96, 98, 100, 102, 106, y 108, respectivamente, en el orden de aparición).

[0045] La figura 9 muestra el árbol filogenético de ClfA.

[0046] La figura 10A a 10E muestran el alineamiento de ClfB entre varias cepas de S. aureus (SEQ ID n.^{os}: 26, 28, 32, 18, 54, 34, 36, 30, 16, 20, 22, 24, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 56, 58, y 60, respectivamente, en el orden de aparición).

[0047] La figura 11 muestra el árbol filogenético de ClfB.

[0048] La figura 12 muestra el alineamiento de MntC entre varias cepas de S. aureus (SEQ ID n.^{os}: 2, 8, 10, 4, 6, 14 y 12, respectivamente, en el orden de aparición).

[0049] La figura 13 muestra que los anticuerpos anti-ClfA de conejo policlonales reducen los recuentos de colonia 659 a 018 de S. aureus en un modelo murino de septicemia.

[0050] La figura 14 muestra que inmunización activa con ClfA reduce la colonización del corazón mediante S. aureus PFESA0003 en el modelo de endocarditis infecciosa de conejo.

[0051] Las figuras 15A y 15B muestran que la inmunización con MntC reduce S. aureus en la sangre. A: cepa de S. aureus PFESA0237; B: cepa de S. aureus PFESA0266.

[0052] La figura 16 muestra que la formulación inmunogénica de conjugado de CP5 de S. aureus-CRM_{197} consistentemente exhibe protección en un modelo de pielonefritis murino.

[0053] La figura 17 muestra que la vacunación con una formulación inmunogénica de conjugado de CP8-CRM_{197} reduce muerte en un modelo de septicemia.

[0054] La figura 18 muestra unidades de formación de colonias (UFC) recuperadas en riñones después de una exposición a PFESA0266 de S. aureus en ratones vacunados con CP5-CRM de alto peso molecular (HMW), CP5-CRM de bajo peso molecular (LMW) o control de PP5-CRM.

[0055] La figura 19 muestra una comparación de títulos de OPA (media geométrica) a partir de suero que se obtiene a partir de ratones vacunados con diferentes formulaciones de polisacárido conjugado (CP5-CRM de alto peso molecular (HMW), CP5-CRM de bajo peso molecular (LMW)). Los grupos consistieron en de 5 a 9 ratones.

[0056] La figura 20 muestra título de OPA para suero de primate no humano antes (sem0, open symbols) y 2 semanas después (sem2, closed symbols) de la vacunación con diferentes combinaciones de antígenos S. aureus. La vacuna de 3 antígenos (3Ag) estaba compuesta por tres antígenos y la vacuna de 4 antígenos (4Ag) estaba compuesta por cuatro antígenos. Cada formulación tiene dos conjugados de CP y o bien 1 o bien 2 péptidos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

101

[0057] Antes de que se describan los presentes procedimientos y metodología de tratamiento, ha de entenderse que la presente invención no se limita a procedimientos particulares, y condiciones experimentales que se describen, debido a que tales procedimientos y condiciones pueden variar. Ha de entenderse también que la terminología que se usa en el presente documento es sólo para los fines de descripción de las realizaciones particulares, y no se pretende que sean limitantes.

[0058] A pesar de que cualesquiera procedimientos y materiales similares o equivalentes a los que se describen en el presente documento pueden usarse en la práctica o realización de pruebas de la invención, los procedimientos y materiales preferidos se describen a continuación. Todas las publicaciones que se mencionan en el presente documento se incorporan por referencia en su totalidad.

[0059] Las expresiones que se usan en el presente documento tienen los significados que conocen y reconocen los expertos en la técnica, no obstante, por conveniencia y compleción, se exponen a continuación una expresiones particulares y sus significados.

[0060] Tal como se usa en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", y "el/la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, las referencias a "el procedimiento" incluyen uno o más procedimientos, y/o etapas del tipo que se describe en el presente documento y/o que se harán evidentes para los expertos en la técnica tras la lectura de la presente divulgación, etcétera.

[0061] La expresión "aproximadamente" o "de forma aproximada" quiere decir dentro de un intervalo estadísticamente significativo de un valor. Un intervalo de este tipo puede estar dentro de un orden de magnitud, habitualmente dentro de un 20 %, más habitualmente aún dentro de un 10 %, e incluso más habitualmente dentro de un 5 % de un valor o intervalo dado. La variación admisible abarcada por la expresión "aproximadamente" o "de forma aproximada" depende del sistema particular sometido a estudio, y puede apreciarse fácilmente por un experto en la técnica. Siempre que se menciona un intervalo dentro de la presente solicitud, cada número entero en su totalidad dentro del intervalo se contempla también como una realización de la invención.

[0062] Un "anticuerpo" es una molécula de inmunoglobulina capaz de unión específica a una diana, tal como un carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno, que se encuentra en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Tal como se usa en el presente documento, a menos que se indique de otro modo por el contexto, se pretende que la expresión abarque no sólo anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, sino también anticuerpos diseñados por ingeniería genética (por ejemplo, quiméricos, humanizados y/o derivados para efectuar funciones de efector, estabilidad y otras actividades biológicas) y fragmentos de los mismos (tales como Fab, Fab', F(ab')2, Fv), anticuerpos de cadena única (ScFv) y de dominio, lo que incluye anticuerpos de tiburón y de camélido), y proteínas de fusión que comprenden una parte de anticuerpo, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos a

102

condición de que éstos exhiban la actividad biológica deseada) y fragmentos de anticuerpo tal como se describe en el presente documento, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno. Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, tal como IgG, IgA, o IgM (o subclase de los mismos), y el anticuerpo no ha de ser de ninguna clase particular. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de anticuerpo del dominio constante de sus cadenas pesadas, pueden asignarse inmunoglobulinas a clases diferentes. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, y IgM, y varias de éstas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2 en los seres humanos. Los dominios constantes de cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, épsilon, gamma, y mu, respectivamente. Las estructuras de subunidad y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

[0063] Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden sólo una parte de un anticuerpo intacto, en el que la parte preferentemente retiene al menos una, preferentemente la mayor parte o la totalidad, de las funciones que se asocian normalmente con esa parte cuando está presente en un anticuerpo intacto.

[0064] La expresión "antígeno" en general se refiere a una molécula biológica, normalmente una proteína, péptido, polisacárido, lípido o conjugado que contiene al menos un epítopo al que puede unirse selectivamente un anticuerpo conjugado; o en algunos casos a una

sustancia inmunogénica que puede estimular la producción de anticuerpos o respuestas de células T, o ambos, en un animal, incluyendo composiciones que se inyectan o se absorben en un animal. La respuesta inmunitaria puede generarse frente a la totalidad de la molécula, o frente a una o más partes varias de la molécula (por ejemplo, un epítopo o hapteno). La expresión puede usarse para referirse a una molécula individual o a una población homogénea o heterogénea de moléculas antigénicas. Un antígeno se reconoce por anticuerpos, receptores de células T u otros elementos de inmunidad humoral y/o celular específica. La expresión "antígeno" incluye todos los epítopos antigénicos relacionados. Los epítopos de un antígeno dado pueden identificarse usando cualquier número de técnicas de asignación de epítopos, que se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols* en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Human Press, Totowa, N. J. Por ejemplo, los epítopos lineales pueden determinarse mediante por ejemplo, sintetizando de forma concurrente un gran número de péptidos en soportes sólidos, correspondiéndose los péptidos con partes de la molécula de proteína, y hacer que reaccionen los péptidos con anticuerpos a la vez que los péptidos están aún unidos a los soportes. Tales técnicas se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos con n.° 4.708.871; Geysen y col. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998 a 4002; Geysen y col. (1986) Molec. Immunol. 23:709 a 715, la totalidad de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia. De forma similar, los epítopos conformacionales pueden identificarse determinando la conformación espacial de los aminoácidos tal como mediante, por ejemplo,

103

cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear en 2 dimensiones. Véase, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols*, citado anteriormente. Además, para los fines de la presente invención, un "antígeno" puede usarse también para referirse a una proteína que incluye modificaciones, tal como deleciones, adiciones y sustituciones (en general de naturaleza conservativa, si bien éstas pueden ser no conservativas), en la secuencia nativa, a condición de que la proteína mantenga la capacidad para provocar una respuesta inmunológica. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de una mutagénesis dirigida al sitio, o a través de unos procedimientos de síntesis particulares, o a través de un enfoque de ingeniería genética, o pueden ser accidentales, tal como a través de mutaciones de huéspedes, que producen los antígenos. Además, el antígeno puede derivarse, obtenerse, o aislarse a partir de un microbio, por ejemplo, una bacteria, o puede ser la totalidad de un organismo. De forma similar, un oligonucleótido o polinucleótido, que expresa un antígeno, tal como en aplicaciones de inmunización de ácido nucleico, se incluye también en la definición. También se incluyen los antígenos de síntesis, por ejemplo, poliepítopos, epítopos flanqueantes, y otros antígenos derivados de forma sintética o recombinante (Bergmann y col. (1993) Eur. J. Immunol. 23:2777 2781; Bergmann y col. (1996) J. Immunol. 157:3242 3249; Suhrbier, A. (1997) Immunol. y Célula Biol. 75:402 408; Gardner y col. (1998) 12th World AIDS Conference, Ginebra, Suiza, de 28 de Junio a 3 de Julio de 1998).

[0065] La expresión "adyuvante" se refiere a un compuesto o mezcla que aumenta la respuesta inmunitaria a un antígeno tal como se describe adicionalmente y se ejemplifica en el presente documento.

[0066] La "bacteriemia" es una presencia transitoria de bacterias en la sangre. Una bacteriemia puede progresar hasta septicemia, o septicemia, que se consideraría una infección y es la presencia persistente de bacterias en la sangre con signos/síntomas clínicos asociados. No todas las bacterias son capaces de sobrevivir en la sangre. Las que pueden, tienen unos rasgos genéticos especiales que prevén esa capacidad. Asimismo, los factores de huésped juegan también un importante papel.

[0067] "Polisacárido capsular" o "polisacárido de cápsula" se refiere a la cápsula de polisacárido que es externa a la pared celular de la mayoría de aislados de estafilococos. Por ejemplo, S. aureus incluye un componente de pared celular que está compuesto por un complejo de peptidoglicano, que permite que el organismo sobreviva bajo unas condiciones osmóticas desfavorables y también incluye un único ácido teicoico unido al peptidoglicano. De forma externa a la pared celular, una cápsula de polisacárido delgada recubre la mayoría de aislados de S. aureus. Esta cápsula serológicamente diferenciada puede usarse para realizar un serotipado de varias aislados de S. aureus. Se ha mostrado que muchos de los aislados clínicamente significativaos incluyen dos tipos capsulares: serotipo 5 (CP5) y serotipo 8 (CP8). Las estructuras de CP5 y CP8 se muestran esquemáticamente en la figura 4.

[0068] Tal como se usa en el presente documento, "conjugados" comprende un polisacárido de cápsula normalmente de un intervalo deseado de peso molecular y una proteína de portador, en el que el polisacárido de cápsula está conjugado con la proteína de portador. Los conjugados pueden o pueden no contener alguna cantidad de polisacárido de cápsula libre. Tal

104

como se usa en el presente documento, "polisacárido de cápsula libre" se refiere a un polisacárido de cápsula que está asociado no covalentemente con (es decir, está unido no covalentemente a, adsorbido a o atrapado en o con) el polisacárido capsular-proteína de portador conjugado. Las expresiones "polisacárido de cápsula libre", "polisacárido libre" y "sacárido libre" pueden usarse de forma intercambiable y se pretende que transmitan el mismo significado. Con independencia de la naturaleza de la molécula portadora, esta puede conjugarse con el polisacárido capsular o bien directamente o bien a través de un ligador. Tal como se usa en el presente documento, "(para) conjugar", "conjugado/a" y "conjugando" se refiere a un proceso mediante el cual un polisacárido capsular bacteriano se une covalentemente a la molécula portadora. La conjugación aumenta la inmunogenicidad del polisacárido capsular bacteriano. La conjugación puede realizarse de acuerdo con los procedimientos que se describen a continuación o mediante procesos que se conocen en la técnica.

[0069] Tal como se describe anteriormente, la presente invención se refiere a conjugados que comprenden polisacáridos capsulares de serotipo 5 (CP5) de S. aureus conjugado con proteínas portadoras y conjugados que comprenden polisacáridos capsulares de serotipo 8 de S. aureus (CP8) conjugado con proteínas portadoras. Una realización de la invención proporciona conjugados que comprenden un polisacárido capsular de serotipo 5 de S. aureus conjugado con una proteína de portador y un polisacárido capsular de serotipo 8 de S. aureus conjugado con una proteína de portador en los que: el polisacárido capsular de tipo 5 tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 800 kDa; el polisacárido capsular de tipo 8 tiene

un peso molecular de entre 50 y 700 kDa; los conjugados inmunogénicos tienen unos pesos moleculares de entre aproximadamente 1.000 kDa y aproximadamente 5.000 kDa; y los conjugados comprenden menos de aproximadamente un 30 % de polisacárido libre en relación con el polisacárido total. En una realización, los conjugados comprenden menos de aproximadamente un 25 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 15 %, aproximadamente un 10 %, o aproximadamente un 5 % de polisacárido libre en relación con el polisacárido total. En una realización, el tipo 5 u 8 polisacárido tiene un peso molecular entre 20 kDa y 1.000 kDa.

[0070] En una realización, el conjugado tiene un peso molecular de entre aproximadamente 50 kDa y aproximadamente 5.000 kDa. En una realización, el conjugado tiene un peso molecular de entre aproximadamente 200 kDa y aproximadamente 5.000 kDa. En una realización, el conjugado inmunogénico tiene un peso molecular de entre aproximadamente 400 kDa y aproximadamente 2.500 kDa. En una realización, el conjugado inmunogénico tiene un peso molecular de entre aproximadamente 500 kDa y aproximadamente 2.500 kDa. En una realización, el conjugado inmunogénico tiene un peso molecular de entre aproximadamente 600 kDa y aproximadamente 2.800 kDa. En una realización, el conjugado inmunogénico tiene un peso molecular de entre aproximadamente 700 kDa y aproximadamente 2.700 kDa. En una realización, el conjugado inmunogénico tiene un peso molecular de entre aproximadamente 1.000 kDa y aproximadamente 2.000 kDa; de entre aproximadamente 1.800 kDa y aproximadamente 2.500 kDa; de entre aproximadamente 1.100 kDa y aproximadamente 2.200 kDa; de entre aproximadamente 1.900 kDa y

105

aproximadamente 2.700 kDa; de entre aproximadamente 1.200 kDa y aproximadamente 2.400 kDa; de entre aproximadamente 1.700 kDa y aproximadamente 2.600 kDa; de entre aproximadamente 1.300 kDa y aproximadamente 2.600 kDa; de entre aproximadamente 1.600 kDa y aproximadamente 3.000 kDa.

[0071] Por consiguiente, en una realización, la proteína de portador dentro del conjugado inmunogénico de la invención es la CRM_{197}, y la CRM_{197} se une covalentemente con el polisacárido capsular a través de un enlace de carbamato, un enlace de amida, o ambos. El número de residuos de lisina en la proteína de portador que se han conjugado con un polisacárido capsular puede caracterizarse como un intervalo de lisinas conjugadas. Por ejemplo, en una composición inmunogénica dada, la CRM_{197} puede comprender de 5 a 15 lisinas de entre 39 con enlace covalente con el polisacárido capsular. Otra forma de expresar este parámetro es que de un 12 % a un 40 % de lisinas de CRM_{197} tienen enlace covalente con el polisacárido capsular. En algunas realizaciones, la parte de CRM_{197} del polisacárido unido covalentemente a la CRM_{197} comprende de 5 a 22 lisinas con enlace covalente con el polisacárido. En algunas realizaciones, la parte de CRM_{197} del polisacárido unido covalentemente a la CRM_{197} comprende de 5 a 23 lisinas con enlace covalente con el polisacárido. En algunas realizaciones, la parte de CRM_{197} del polisacárido unido covalentemente a la proteína de portador de comprende de 8 a 15 lisinas con enlace covalente con el polisacárido. En algunas realizaciones, la parte de CRM_{197} del polisacárido unido covalentemente a la proteína de portador de comprende de 8 a 12 lisinas con enlace covalente con el polisacárido. Por ejemplo, en

una composición inmunogénica dada, la CRM_{197} puede comprender de 18 a 22 lisinas de entre 39 con enlace covalente con el polisacárido capsular. Otra forma de expresar este parámetro es que de un 40 % a un 60 % de lisinas de CRM_{197} tienen enlace covalente con el polisacárido capsular. En algunas realizaciones, la CRM_{197} comprende de 5 a 15 lisinas de entre 39 con enlace covalente con el CP8. Otra forma de expresar este parámetro es que de un 12 % a un 40 % de lisinas de CRM_{197} tienen enlace covalente con el CP8. En algunas realizaciones, la CRM_{197} comprende de 18 a 22 lisinas de entre 39 con enlace covalente con el CP5. Otra forma de expresar este parámetro es que de un 40 % a un 60 % de lisinas de CRM_{197} tienen enlace covalente con el CP5.

[0072] Tal como se analiza anteriormente, el número de residuos de lisina en la proteína de portador conjugado con el polisacárido capsular puede caracterizarse como un intervalo de lisinas conjugadas, que puede expresarse como una razón molar. Por ejemplo, la razón molar de lisinas conjugadas con respecto a CRM_{197} en el conjugado inmunogénico de CP8 puede ser de entre aproximadamente 18:1 a aproximadamente 22:1. En una realización, el intervalo de razón molar de lisinas conjugadas con respecto a CRM_{197} en el conjugado inmunogénico de CP8 puede ser de entre aproximadamente 15:1 a aproximadamente 25:1. En algunas realizaciones, el intervalo de razón molar de lisinas conjugadas con respecto a CRM_{197} en el conjugado inmunogénico de CP8 puede ser de entre aproximadamente 14:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 12:1 a aproximadamente 18:1; de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 16:1; de aproximadamente 8:1 a aproximadamente 14:1; de aproximadamente 6:1

106

a aproximadamente 12:1; de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 10:1; de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 26:1; de aproximadamente 22:1 a aproximadamente 28:1; de aproximadamente 24:1 a aproximadamente 30:1; de aproximadamente 26:1 a aproximadamente 32:1; de aproximadamente 28:1 a aproximadamente 34:1; de aproximadamente 30:1 a aproximadamente 36:1; de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 10:1; de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 20:1; o de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 30:1. Asimismo, la razón molar de lisinas conjugadas con respecto a CRM_{197} en el conjugado inmunogénico de CP5 puede ser de entre aproximadamente 3:1 y 25:1. En una realización, el intervalo de razón molar de lisinas conjugadas con respecto a CRM_{197} en el conjugado inmunogénico de CP5 puede ser de entre aproximadamente 5:1 a aproximadamente 20:1. En una realización, el intervalo de razón molar de lisinas conjugadas con respecto a CRM_{197} en el conjugado inmunogénico de CP5 puede ser de entre aproximadamente 4:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 6:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 7:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 8:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 11:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 12:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 13:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 14:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 15:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 16:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 17:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 18:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente

5:1 a aproximadamente 18:1; de aproximadamente 7:1 a aproximadamente 16:1; o de aproximadamente 9:1 a aproximadamente 14:1.

[0073] Otra forma de expresar el número de residuos de lisina en la proteína de portador conjugado con el polisacárido capsular puede ser como un intervalo de lisinas conjugadas. Por ejemplo, en un conjugado inmunogénico de CP8 dado, la CRM_{197} puede comprender de 5 a 15 lisinas de entre 39 con enlace covalente con el polisacárido capsular. Alternativamente, este parámetro puede expresarse como un porcentaje. Por ejemplo, en un conjugado inmunogénico de CP8 dado, el porcentaje de lisinas conjugadas puede ser de entre un 110 % y un 50 %. En algunas realizaciones, de un 20 % a un 50 % de lisinas puede tener enlace covalente con el CP8. Aún más alternativamente, de un 30 % a un 50 % de lisinas de CRM_{197} puede tener enlace covalente con the CP8; de un 10 % a un 40 % de lisinas de CRM_{197}; de un 10 % a un 30 % de lisinas de CRM_{197}; de un 20 % a un 40 % de lisinas de CRM_{197}; de un 25 % a un 40 % de lisinas de CRM_{197}; de un 30 % a un 40 % de lisinas de CRM_{197}; de un 10 % a un 30 % de lisinas de CRM_{197}; de un 15 % a un 30 % de lisinas de CRM_{197}; de un 20 % a un 30 % de lisinas de CRM_{197}; de un 25 % a un 30 % de lisinas de CRM_{197}; de un 10 % a un 15 % de lisinas de CRM_{197}; o de un 10 % a un 12 % de lisinas de CRM_{197} tienen enlace covalente con el CP8. Asimismo, en un conjugado inmunogénico de CP5 dado, la CRM_{197} puede comprender de 18 a 22 lisinas de entre 39 con enlace covalente con el polisacárido capsular. Alternativamente, este parámetro puede expresarse como un porcentaje. Por ejemplo, en un conjugado inmunogénico de CP5 dado, el porcentaje de lisinas conjugadas puede ser de entre un 40 % y un 60 %. En algunas realizaciones, de un 40

107

% a un 60 % de lisinas puede tener enlace covalente con el CP5. Aún más alternativamente, de un 30 % a un 50 % de lisinas de CRM_{197} puede tener enlace covalente con el CP5; de un 20 % a un 40 % de lisinas de CRM_{197}; de un 10 % a un 30 % de lisinas de CRM_{197}; de un 50 % a un 70 % de lisinas de CRM_{197}; de un 35 % a un 65 % de lisinas de CRM_{197}; de un 30 % a un 60 % de lisinas de CRM_{197}; de un 25 % a un 55 % de lisinas de CRM_{197}; de un 20 % a un 50 % de lisinas de CRM_{197}; de un 15 % a un 45 % de lisinas de CRM_{197}; de un 10 % a un 40 % de lisinas de CRM_{197}; de un 40 % a un 70 % de lisinas de CRM_{197}; o de un 45 % a un 75 % de lisinas de CRM_{197} tienen enlace covalente con el CP5.

[0074] La frecuencia de unión de la cadena de polisacárido capsular a una lisina en la molécula portadora es otro parámetro para la caracterización de conjugados de polisacáridos de cápsula. Por ejemplo, en una realización, al menos un enlace covalente entre CRM_{197} y polisacárido tiene lugar para al menos cada de 5 a 10 unidades de repetición de sacárido del polisacárido capsular. En otra realización, hay al menos un enlace covalente entre CRM_{197} y polisacárido capsular para cada de 5 a 10 unidades de repetición de sacárido; cada de 2 a 7 unidades de repetición de sacárido, cada de 3 a 8 unidades de repetición de sacárido; cada de 4 a 9 unidades de repetición de sacárido; cada de 6 a 11 unidades de repetición de sacárido; cada de 7 a 12 unidades de repetición de sacárido; cada de 8 a 13 unidades de repetición de sacárido; cada de 9 a 14 unidades de repetición de sacárido; cada de 10 a 15 unidades de repetición de sacárido; cada de 2 a 6 unidades de repetición de sacárido, cada de 3 a 7 unidades de repetición de sacárido; cada de 4 a 8 unidades de repetición de sacárido; cada de 6 a 10 unidades

de repetición de sacárido; cada de 7 a 11 unidades de repetición de sacárido; cada de 8 a 12 unidades de repetición de sacárido; cada de 9 a 13 unidades de repetición de sacárido; cada de 10 a 14 unidades de repetición de sacárido; cada de 10 a 20 unidades de repetición de sacárido; cada de 5 a 10 unidades de repetición de sacárido del polisacárido capsular. En otra realización, al menos un enlace entre CRM_{197} y polisacárido capsular tiene lugar para cada 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 unidades de repetición de sacárido del polisacárido capsular.

[0075] La activación química de los polisacáridos y la conjugación posterior con la proteína de portador pueden obtenerse por medios convencionales. Véanse, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos con n.ºs 4.673.574 y 4.902.506. Otros procedimientos de activación y de conjugación pueden usarse alternativamente.

[0076] "Proteína de portador" o "portador de proteína" tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier molécula de proteína que puede conjugarse con un antígeno (tal como los polisacáridos capsulares) frente a la que se desea una respuesta inmunitaria. La conjugación de un antígeno tal como un polisacárido con una proteína de portador puede dar lugar a que el antígeno sea inmunogénico. Las proteínas de portador son preferentemente proteínas que son no tóxicas y no reactogénicas y que pueden obtenerse en suficiente cantidad y pureza. Ejemplos de proteínas portadoras son toxinas, toxoides o cualquier material de reacción cruzada mutante (CRM_{197}) de la toxina a partir de tétanos, difteria, tos ferina, especies Pseudomonas, E. coli, especies de Staphylococcus, y especies de Streptococcus. Las proteínas de portador deberían de poder someterse a

108

procedimientos de conjugación convencionales. En una realización particular de la presente invención, se usa CRM_{197} como la proteína de portador.

[0077] CRM_{197} (Wyeth/Pfizer, Sanford, NC) es una variante no tóxica (es decir, un toxoide) de toxina diftérica aislada a partir de cultivos de la cepa C7 de Corynebacterium diphtheriae (β197) que se hace crecer en casaminoácidos y en un medio basado en extracto de levadura. CRM_{197} se purifica a través de ultra-filtración, precipitación de sulfato de amonio, y cromatografía de intercambio iónico. Un cultivo de cepa C7 de Corynebacterium diphtheriae (197), que producen la proteína CRM_{197}, se ha depositado con la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, Maryland y se le ha asignado el número de registro ATCC 53281. Otros toxoides diftéricos son también adecuados para su uso como proteínas portadoras.

[0078] Otras proteínas portadoras adecuadas incluyen toxinas bacterianas inactivadas tales como toxoide tetánico, toxoide de tos ferina, toxoide del cólera (por ejemplo, tal como se describe en la solicitud de patente internacional WO2004/083251), E. coli LT, E. coli ST, y exotoxina A a partir de Pseudomonas aeruginosa. Pueden también usarse proteínas de la membrana exterior bacteriana tal como el complejo de proteína de la membrana exterior c (OMPC), porinas, proteínas de unión a transferrina, neumolisina, proteína de superficie neumocócica A (PspA), proteína de adhesina neumocócica (PsaA), enterotoxina de C. difficile (toxina A) y citotoxina (toxina B) o proteína de Haemophilus influenzae D. Otras proteínas, tal como ovalbúmina, hemocianina de la lapa californiana (KLH), albúmina de suero bovino (BSA) o derivado de proteína purificado de la tuberculina (PPD) pueden usarse también como proteínas portadoras.

[0079] Después de la conjugación del polisacárido capsular con la proteína de portador, los conjugados de polisacárido-proteína se purifican (se enriquecen con respecto a la cantidad de conjugado de polisacárido-proteína) mediante una variedad de técnicas. Estas técnicas incluyen, por ejemplo, operaciones de concentración/diafiltración, precipitación/elución, cromatografía en columna, y filtración profunda. Véanse los ejemplos a continuación.

[0080] Después de los conjugados individuales se purifican, éstos pueden combinarse para formular una composición inmunogénica de la presente invención, que puede usarse, por ejemplo, en una vacuna. La formulación de la composición inmunogénica de la presente invención puede llevarse a cabo usando procedimientos reconocidos en la técnica.

[0081] Se observa que en la presente divulgación, expresiones tales como "comprende", "comprendido/a", "comprendiendo/ que comprende", "contiene", "conteniendo/ que contiene" y similares pueden tener el significado que se les atribuye en la ley de patentes de los Estados Unidos; por ejemplo, éstas pueden significar "incluye", "incluido/a", "incluyendo/ que incluye" y similares. Tales expresiones se refieren a la inclusión de unos componentes particulares o conjunto de componentes sin excluir cualesquiera otros componentes. Expresiones tales como "consistiendo/ que consiste esencialmente en" y "consiste esencialmente en" tienen el significado que se les atribuye en la ley de patentes de los Estados Unidos, por ejemplo, éstas permiten la inclusión de componentes o etapas adicionales que no restan valor a las características novedosas o básicas de la invención, es decir, éstas excluyen componentes o etapas no

mencionados adicionales que restan valor a las características novedosas o básicas de la invención, y éstas excluyen componentes o etapas de la técnica anterior, tal como documentos en la técnica que se indican en el presente documento o se incorporan por referencia en el presente documento, especialmente debido a que es un objetivo del presente documento definir unas realizaciones que pueden patentarse, por ejemplo, novedosas, no obvias, de la invención, sobre la técnica anterior, por ejemplo, sobre los documentos que se indican en el presente documento o que se incorporan por referencia en el presente documento. Y, las expresiones "consiste en" y "consistiendo/ que consiste en" tienen el significado que se atribuye a éstas en la ley de patentes de los Estados Unidos; a saber, que estas expresiones son cerradas. Por consiguiente, estas expresiones se refieren a la inclusión de un conjunto de componentes o un componente particular y a la exclusión de todos los otros componentes.

[0082] Una "sustitución de aminoácidos conservativas" se refiere a la sustitución de uno o más de los residuos de aminoácido de una proteína con otros residuos de aminoácido que tienen propiedades físicas y/o químicas similares. Sustitutos para un aminoácido dentro de la secuencia pueden seleccionarse de otros miembros de la clase a la que pertenece el aminoácido. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Aminoácidos con contenido en estructuras de anillo aromático son fenilalanina, triptófano, y tirosina. Los aminoácidos neutrales polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, y glutamina. Los aminoácidos con carga positiva (básicos) incluyen arginina, lisinas e

histidina. Los aminoácidos con carga negativa (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. No se espera que tales alteraciones afecten al peso molecular aparente tal como se determina por electroforesis de gel de poliacrilamida, o punto isoeléctrico. Sustituciones preferidas particulares son: Lys para Arg y viceversa de tal modo que puede mantenerse una carga positiva; Glu para Asp y viceversa de tal modo que puede mantenerse una carga negativa; Ser para Thr de tal modo que puede mantenerse un -OH libre; y Gln para Asn de tal modo que puede mantenerse un NH2 libre.

[0083] "Fragmento" se refiere a proteínas en las que sólo se incluyen dominios específicos de una proteína más grande. Por ejemplo, proteínas de ClfA y ClfB contienen tantos como 8 dominios cada una si se incluyen las secuencias señal. Se considera que cada uno de un polipéptido que se corresponde con los dominios N1N2N3, N2N3, N1N2, N1, N2, o N3 son fragmentos de ClfA o ClfB. "Fragmento" también se refiere a o bien una proteína o bien un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 4 residuos de aminoácido (preferentemente, de al menos 10 residuos de aminoácido, de al menos 15 residuos de aminoácido, de al menos 20 residuos de aminoácido, de al menos 25 residuos de aminoácido, de al menos 40 residuos de aminoácido, de al menos 50 residuos de aminoácido, de al menos 60 residuos de aminoácido, de al menos 70 residuos de aminoácido, de al menos 80 residuos de aminoácido, de al menos 90 residuos de aminoácido, de al menos 100 residuos de aminoácido, de al menos 125 residuos de aminoácido, o al menos 150 residuos de aminoácido) de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido o proteína original o un ácido nucleico que comprende una secuencia de

110

nucleótidos de al menos 10 pares de bases (preferentemente de al menos 20 pares de bases, de al menos 30 pares de bases, de al menos 40 pares de bases, de al menos 50 pares de bases, de al menos 50 pares de bases, de al menos 100 pares de bases, de al menos 200 pares de bases) de la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico original.

[0084] "Actividad funcional" de un anticuerpo o "anticuerpo funcional", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que, en un mínimo, puede unirse específicamente con un antígeno. Funciones adicionales se conocen en la técnica y pueden incluir componentes adicionales del sistema inmunitario que efectúan el aclaramiento o la destrucción del patógeno tal como a través de opsonización, ADCC o citotoxicidad mediada por complemento. Después de la unión de antígeno, cualesquiera funciones de anticuerpo posteriores pueden mediarse a través de la región Fc del anticuerpo. El ensayo de anticuerpo opsonofagocítico (OPA) es un ensayo *in vitro* diseñado para medir la destrucción de bacterias asistida por complemento Ig *in vitro* con células efectoras (glóbulos blancos), que de este modo imita un proceso biológico. La unión de anticuerpos puede también inhibir directamente la función biológica del antígeno al que se une, por ejemplo, anticuerpos que se unen a ClfA pueden neutralizar su función enzimática. En algunas realizaciones, un "anticuerpo funcional" se refiere a un anticuerpo que es funcional tal como se mide por la destrucción de bacterias en un modelo de eficacia animal o un ensayo de destrucción opsonofagocítica que muestra que los anticuerpos destruyen las bacterias.

[0085] El peso molecular de los polisacáridos de cápsula de S. aureus es una consideración para su uso en composiciones inmunogénicas. Por

ejemplo, los polisacáridos de cápsula de alto peso molecular pueden ser capaces de inducir ciertas respuestas inmunitarias de anticuerpo debido a una valencia más alta de los epítopos presentes en la superficie antigénica. El aislamiento de los "polisacáridos capsulares de alto peso molecular" se contempla para su uso en las composiciones y procedimientos de la presente invención. Por ejemplo, en una realización de la invención, se contempla el aislamiento de polisacáridos de tipo 5 de alto peso molecular que varían en tamaño de aproximadamente 50 a aproximadamente 800 kDa en peso molecular. En una realización de la invención, se contempla el aislamiento de polisacáridos de tipo 5 de alto peso molecular que varían en tamaño de aproximadamente 20 a aproximadamente 1.000 kDa en peso molecular. En una realización de la invención, se contempla el aislamiento y la purificación de tipo 5 polisacáridos capsulares de alto peso molecular que varían en tamaño de aproximadamente 50 a aproximadamente 300 kDa en peso molecular. En una realización, se contempla el aislamiento y la purificación de polisacárido capsular de alto peso molecular de tipo 5 que varía de 70 kDa a 300 kDa en peso molecular. En una realización, se contempla el aislamiento y la purificación de polisacárido capsular de alto peso molecular de tipo 5 que varía de 90 kDa a 250 kDa en peso molecular. En una realización, se contempla el aislamiento y la purificación de polisacárido capsular de alto peso molecular de tipo 5 que varía de 90 kDa a 150 kDa en peso molecular. En una realización, se contempla el aislamiento y la purificación de polisacárido capsular de alto peso molecular de tipo 5 que varía de 90 kDa a 140 kDa en peso molecular. En una realización, se contempla el aislamiento y la purificación de polisacárido capsular de alto

peso molecular de tipo 5 que varía de 80 kDa a 120 kDa en peso molecular. Otros intervalos de alto peso molecular polisacárido capsular de serotipo 5 que puede aislarse y purificarse mediante los procedimientos de la presente invención incluyen intervalos de tamaño de aproximadamente 70 kDa a aproximadamente 100 kDa en peso molecular; de 70 kDa a 110 kDa en peso molecular; de 70 kDa a 120 kDa en peso molecular; de 70 kDa a 130 kDa en peso molecular; de 70 kDa a 140 kDa en peso molecular; de 70 kDa a 150 kDa en peso molecular; de 70 kDa a 160 kDa en peso molecular; de 80 kDa a 110 kDa en peso molecular; de 80 kDa a 120 kDa en peso molecular; de 80 kDa a 130 kDa en peso molecular; de 80 kDa a 140 kDa en peso molecular; de 80 kDa a 150 kDa en peso molecular; de 80 kDa a 160 kDa en peso molecular; de 90 kDa a 110 kDa en peso molecular; de 90 kDa a 120 kDa en peso molecular; de 90 kDa a 130 kDa en peso molecular; de 90 kDa a 140 kDa en peso molecular; de 90 kDa a 150 kDa en peso molecular; de 90 kDa a 160 kDa en peso molecular; de 100 kDa a 120 kDa en peso molecular; de 100 kDa a 130 kDa en peso molecular; de 100 kDa a 140 kDa en peso molecular; de 100 kDa a 150 kDa en peso molecular; de 100 kDa a 160 kDa en peso molecular; e intervalos deseados similares de peso molecular.

[0086] Tal como se analiza anteriormente, el peso molecular de los polisacáridos de cápsula de S. aureus es una consideración para su uso en composiciones inmunogénicas. Por ejemplo, los polisacáridos de cápsula de alto peso molecular pueden ser capaces de inducir ciertas respuestas inmunitarias de anticuerpo debido a una valencia más alta de los epítopos presentes en la superficie antigénica. En una realización de la invención, se

contempla el aislamiento y la purificación de polisacáridos capsulares de alto peso molecular de tipo 8 que varían de aproximadamente 20 kDa a aproximadamente 1.000 kDa en peso molecular. En una realización de la invención, se contempla el aislamiento y la purificación de polisacáridos capsulares de alto peso molecular de tipo 8 que varían de aproximadamente 50 kDa a aproximadamente 700 kDa en peso molecular. En una realización de la invención, se contempla el aislamiento y la purificación de polisacáridos capsulares de alto peso molecular de tipo 8 que varían de 50 kDa a 300 kDa en peso molecular. En una realización, se contempla el aislamiento y la purificación de polisacárido capsular de tipo 8 de alto peso molecular variando de 70 kDa a 300 kDa en peso molecular. En una realización, se contempla el aislamiento y la purificación de polisacáridos capsulares de alto peso molecular de tipo 8 que varían de 90 kDa a 250 kDa en peso molecular. En una realización, se contempla el aislamiento y la purificación de polisacáridos capsulares de alto peso molecular de tipo 8 que varían de 90 kDa a 150 kDa en peso molecular. En una realización, se contempla. el aislamiento y la purificación de polisacáridos capsulares de alto peso molecular de tipo 8 que varían de 90 kDa a 120 kDa en peso molecular En una realización, se contempla el aislamiento y la purificación de polisacáridos capsulares de alto peso molecular de tipo 8 que varían de 80 kDa a 120 kDa en peso molecular. Otros intervalos de polisacáridos capsulares de serotipo 8 de alto peso molecular que pueden aislarse y purificarse mediante los procedimientos de la presente invención incluyen intervalos de tamaño de aproximadamente 70 kDa a aproximadamente 100 kDa en peso molecular; de 70 kDa a 110 kDa en peso molecular; de 70 kDa

112

a 120 kDa en peso molecular; de 70 kDa a 130 kDa en peso molecular; de 70 kDa a 140 kDa en peso molecular; de 70 kDa a 150 kDa en peso molecular; de 70 kDa a 160 kDa en peso molecular; de 80 kDa a 110 kDa en peso molecular; de 80 kDa a 120 kDa en peso molecular; de 80 kDa a 130 kDa en peso molecular; de 80 kDa a 140 kDa en peso molecular; de 80 kDa a 150 kDa en peso molecular; de 80 kDa a 160 kDa en peso molecular; de 90 kDa a 110 kDa en peso molecular; de 90 kDa a 120 kDa en peso molecular; de 90 kDa a 130 kDa en peso molecular; de 90 kDa a 140 kDa en peso molecular; de 90 kDa a 150 kDa en peso molecular; de 90 kDa a 160 kDa en peso molecular; de 100 kDa a 120 kDa en peso molecular; de 100 kDa a 130 kDa en peso molecular; de 100 kDa a 140 kDa en peso molecular; de 100 kDa a 150 kDa en peso molecular; de 100 kDa a 160 kDa en peso molecular; e intervalos deseados similares de peso molecular.

[0087] Una "respuesta inmunitaria" frente a una composición inmunogénica es el desarrollo en un sujeto de una respuesta inmunitaria humoral y/o una respuesta inmunitaria mediada por células frente a moléculas presentes en la composición de interés (por ejemplo, un antígeno, tal como una proteína o polisacárido). Para los fines de la presente invención, una "respuesta inmunitaria humoral" es una respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos e implica la generación de anticuerpos con afinidad por los antígenos presentes en las composiciones inmunogénicas de la invención, mientras que una "respuesta inmunitaria mediada por células" es una respuesta mediada por linfocitos T y/u otros glóbulos blancos. Una "respuesta inmunitaria mediada por células" se provoca mediante la presentación de epítopos antigénicos en asociación con moléculas de clase I o de clase II del

complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Ésta activa células T CD4+ cooperadoras específicas de antígeno o linfocitos T citotóxicos CD8+ ("CTL"). Los CTL tienen espeficificidad por antígenos peptídicos o lipídicos que se presentan en asociación con proteínas codificadas por el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) o CD1 y que se expresan sobre las superficies de células. Los CTL ayudan a inducir y promover la destrucción intracelular de microbios intracelulares, o la lisis de células infectadas con tales microbios. Otro aspecto de la inmunidad celular implica una respuesta específica de antígeno mediante las células T cooperadoras. Las células T cooperadoras actúan para ayudar a estimular la función, y enfocan la actividad de, células efectoras no específicas frente a células que muestran antígenos peptídicos en asociación con moléculas de CMH clásicas o no clásicas en su superficie. Una "respuesta inmunitaria mediada por células" también se refiere a la producción de citocinas, quimiocinas y otras moléculas de este tipo que se producen mediante células T activadas y/u otros glóbulos blancos, incluyendo las derivadas de células T CD4+ y CD8+. La capacidad de una composición o antígeno particular para estimular una respuesta inmunológica mediada por células puede determinarse mediante un número de ensayos, tal como mediante ensayos de linfoproliferación (activación de linfocitos), ensayos de células citotóxicas CTL, sometiendo a ensayo linfocitos T específicos para el antígeno en un sujeto sensibilizado, o mediante la medición de la producción de citocinas por células T en response to restimulation con antígeno. Tales ensayos se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Erickson y col., J. Immunol. (1993) 151:4189 a 4199; Doe y col., Eur. J. Immunol. (1994) 24:2369 a 2376.

113

[0088] La expresión "inmunogénico/a" se refiere a la capacidad de un antígeno o una vacuna para provocar una respuesta inmunitaria, o bien humoral o bien mediada por célula, o ambas.

[0089] Una "cantidad inmunogénica", o una "cantidad inmunológicamente eficaz" o "dosis", cada una de las cuales se usa de forma intercambiable en el presente documento, en general se refiere a la cantidad de antígeno o composición inmunogénica suficiente para provocar una respuesta inmunitaria, o bien una respuesta celular (célula T) o bien humoral (célula B o anticuerpo), o ambas, tal como se mide por ensayos convencionales conocidos por un experto en la técnica.

[0090] La cantidad de un conjugado particular en una composición se calcula en general en base al polisacárido total, conjugado y no conjugado para ese conjugado. Por ejemplo, un conjugado de CP5 con un 20 % de polisacárido libre tendrá aproximadamente 80 mcg de polisacárido conjugado de CP5 y aproximadamente 20 mcg de polisacárido CP5 no conjugado en una dosis de polisacárido CP5 de 100 mcg. La contribución de la proteína al conjugado no se considera normalmente cuando se calcula la dosis de un conjugado. La cantidad de conjugado puede variar dependiendo del serotipo estafilocócico. En general, cada dosis comprenderá de 0,01 a 100 mcg de polisacárido, en particular de 0,1 a 10 mcg, y más particularmente de 1 a 10 mcg. La "cantidad inmunogénica" de los componentes de polisacárido diferentes en la composición inmunogénica, puede divergir y cada uno puede comprender 0,01 mcg, 0,1 mcg, 0,25 mcg, 0,5 mcg, 1 mcg, 2 mcg, 3 mcg, 4 mcg, 5 mcg, 6 mcg, 7 mcg, 8 mcg, 9 mcg, 10 mcg, 15 mcg, 20 mcg,

30 mcg, 40 mcg,50 mcg, 60 mcg, 70 mcg, 80 mcg, 90 mcg, o aproximadamente 100 mcg de cualquier antígeno de polisacárido particular.

[0091] En otra realización, la "cantidad inmunogénica" de los componentes de proteína en la composición inmunogénica, puede variar entre aproximadamente 10 mcg a aproximadamente 300 mcg de cada antígeno proteico. En una realización particular, la "cantidad inmunogénica" de los componentes de proteína en la composición inmunogénica, puede variar entre aproximadamente 20 mcg a aproximadamente 200 mcg de cada antígeno proteico. La "cantidad inmunogénica" de los diferentes componentes de proteína en la composición inmunogénica pueden divergir, y comprenden cada uno 10 mcg, 20 mcg, 30 mcg, 40 mcg, 50 mcg, 60 mcg, 70 mcg, 80 mcg, 90 mcg, 100 mcg, 125 mcg, 150 mcg, 175 mcg o aproximadamente 200 mcg de cualquier antígeno proteico particular.

[0092] La eficacia de un antígeno como un inmunógeno puede medirse midiendo los niveles de actividad de célula B midiendo los niveles de anticuerpos en circulación específicos para el antígeno en el suero usando inmunoensayos, ensayos de inmunoprecipitación, ensayos de anticuerpo funcional, tales como ensayo opsónico *in vitro* y muchos otros ensayos que se conocen en la técnicaotra medida de eficacia de un antígeno como un inmunógeno de célula T puede medirse mediante o bien mediante ensayos de proliferación, o bien mediante ensayos citolíticos, tales como ensayos de liberación de cromo para medir la capacidad de una célula T para lisar su célula diana específica. Además, en la presente invención, una "cantidad inmunogénica" puede también ser defined midiendo los niveles en suero de anticuerpo específico de antígeno que se induce a continuación de la

administración del antígeno, o, midiendo la capacidad de los anticuerpos que se inducen de tal forma para aumentar la capacidad opsonofagocítica de glóbulos blancos particulares, tal como se describe en el presente documento. El nivel de protección de la respuesta inmunitaria puede medirse exponiendo el huésped inmunizado al antígeno que se ha inyectado. Por ejemplo, si el antígeno con respecto al que se desea una respuesta inmunitaria es una bacteria, el nivel de protección que se induce mediante la "cantidad inmunogénica" del antígeno puede medirse detectando el porcentaje de supervivencia o el porcentaje de mortalidad después de una exposición de los animales a las células bacterianas. En una realización, la cantidad de protección puede medirse midiendo al menos un síntoma asociado con la infección bacteriana, por ejemplo, una fiebre asociada con la infección. La cantidad de cada uno de los antígenos en la vacuna o en las composiciones inmunogénicas multiantígeno o multicomponente variará con respecto a cada uno de los otros componentes y puede determinarse mediante procedimientos conocidos por el experto. Tales procedimientos incluirían, por ejemplo, procedimientos para medir la inmunogenicidad y/o la eficacia *in vivo*.

[0093] La expresión "composición inmunogénica" se refiere a cualquier composición farmacéutica con contenido en un antígeno, por ejemplo, un microorganismo, o un componente del mismo, composición que puede usarse para provocar una respuesta inmunitaria en un sujeto. Las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden usarse para tratar un ser humano susceptible de infección por S. aureus, por medio de administración de las composiciones inmunogénicas a través de a sistémico

transdérmica o mucosal vía. Estas administraciones pueden incluir una inyección a través de las vías intramuscular (IM), intraperitoneal (i.p.), intradérmica (ID) o subcutánea; la aplicación mediante un parche u otro dispositivo de administración transdérmica; o a través de administración mucosa a los tractos oral/alimentario, respiratorio o genitourinario. En una realización, se usa una administración intranasal para el tratamiento o prevención de estado nasofaríngeo de portador de S. aureus, atenuando de este modo la infección en su fase más temprana. En una realización, la composición inmunogénica puede usarse en la fabricación de una vacuna o en la obtención de unos anticuerpos policlonales o monoclonales que podrían usarse para proteger o para tratar de forma pasiva un animal.

[0094] Pueden determinarse unas cantidades óptimas de componentes para una composición inmunogénica particular mediante unos estudios convencionales que implican la observación de unas respuestas inmunitarias apropiadas en los sujetos. Siguiendo una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo separadas de forma adecuada.

[0095] En una realización de la presente invención, la composición inmunogénica de S. aureus comprende un fragmento de factor de aglutinación A (ClfA) de S. aureus recombinante (N1N2N3, o combinaciones de los mismos), un tipo 5 de polisacáridos capsulares aislado conjugado con CRM_{197} y un tipo 8 de polisacáridos capsulares aislado conjugado con CRM_{197}. En otra realización, la composición inmunogénica de S. aureus es una formulación estéril (líquida, liofilizada, vacuna de ADN, preparación intradérmica) de fragmento de factor de aglutinación A (ClfA) de S. aureus

115

recombinante (N1N2N3, o combinaciones de los mismos), fragmento de factor de aglutinación B (ClfB) de S. aureus recombinante (N1N2N3, o combinaciones de los mismos), un tipo 5 de polisacáridos capsulares aislado conjugado con CRM_{197} y un tipo 8 de polisacáridos capsulares aislado conjugado con CRM_{197}. En una realización de la presente invención, la composición inmunogénica de S. aureus comprende un fragmento de factor de aglutinación A (ClfA) de S. aureus recombinante (N1N2N3, o combinaciones de los mismos), una proteína MntC de unión a hierro de S. aureus, un tipo 5 de polisacáridos capsulares aislado conjugado con CRM_{197} y un tipo 8 de polisacáridos capsulares aislado conjugado con CRM_{197}. En una realización, la composición inmunogénica de S. aureus es una formulación estéril (líquida, liofilizada, vacuna de ADN, preparación intradérmica) de fragmento de factor de aglutinación A (ClfA) de S. aureus recombinante (N1N2N3, o combinaciones de los mismos), fragmento de factor de aglutinación B (ClfB) de S. aureus recombinante (N1N2N3, o combinaciones de los mismos), una proteína MntC de unión a hierro de S. aureus, un tipo 5 de polisacáridos capsulares aislado conjugado con CRM_{197} y un tipo 8 de polisacáridos capsulares aislado conjugado con CRM_{197}. En una realización de la presente invención, la composición inmunogénica de S. aureus comprende un fragmento de factor de aglutinación B (ClfB) de S. aureus recombinante (N1N2N3, o combinaciones de los mismos), un tipo 5 de polisacáridos capsulares aislado conjugado con CRM_{197} y un tipo 8 de polisacáridos capsulares aislado conjugado con CRM_{197}. En una realización de la presente invención, la composición inmunogénica de S. aureus comprende un fragmento de factor de aglutinación B (ClfB) de S. aureus

recombinante (N1N2N3, o combinaciones de los mismos), una proteína MntC de unión a hierro de S. aureus, un tipo 5 de polisacáridos capsulares aislado conjugado con CRM_{197} y un tipo 8 de polisacáridos capsulares aislado conjugado con CRM_{197}. En una realización de la presente invención, la composición inmunogénica de S. aureus comprende una proteína MntC de unión a hierro de S. aureus, un tipo 5 de polisacáridos capsulares aislado conjugado con CRM_{197} y un tipo 8 de polisacáridos capsulares aislado conjugado con CRM_{197}.

[0096] Las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden comprender además uno o más "inmunomoduladores" adicionales, que son agentes que perturban o alteran el sistema inmunitario, de tal modo que se observa o bien una regulación por aumento o bien una regulación por disminución de inmunidad mediada de forma celular y/o humoral. En una realización particular, se prefiere la regulación por aumento de las armas mediadas de forma celular y/o humoral del sistema inmunitario. Ejemplos de ciertos inmunomoduladores incluyen, por ejemplo, un adyuvante o citocina, o ISCOMATRIX (CSL Limited, Parkville, Australia), que se describe en la patente de los Estados Unidos con n.° 5.254.339 entre otros. Unos ejemplos no limitantes de adyuvantes que pueden usarse en la vacuna de la presente invención incluyen el sistema de adyuvante RIBI (Ribi Inc., Hamilton, Mont.), alumbre, geles minerales tales como gel de hidróxido de aluminio, emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite tales como, por ejemplo, adyuvantes completos e incompletos de Freund, copolímero de Block (CytRx, Atlanta Ga.), QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge Mass.), SAF-M (Chiron, Emeryville Calif.), Adyuvante Amphigen®, saponina,

116

Quil A u otra fracción de saponina, lípido monofosforílico A, y adyuvante lípido-amina Avridine. Unos ejemplos no limitantes de emulsiones de aceite en agua útiles en la vacuna de la invención incluyen las formulaciones SEAM62 y SEAM 1/2 modificadas. La SEAM62 modificada es una emulsión de aceite en agua con contenido en un 5 % (v/v) de escualeno (Sigma), un 1 % (v/v) de detergente SPAN® 85 (ICI Surfactants), un 0,7 % (v/v) de detergente polysorbate ® 80 (ICI Surfactants), un 2,5 % (v/v) de etanol, 200 µg/ml de Quil A, 100 µg/ml de colesterol, y un 0,5 % (v/v) de lecitina. La SEAM 1/2 modificada es una emulsión de aceite en agua que comprende un 5 % (v/v) de escualeno, un 1 % (v/v) de detergente SPAN® 85, un 0,7 % (v/v) de detergente polysorbate 80, un 2,5 % (v/v) de etanol, 100 µg/ml de Quil A, y 50 µg/ml de colesterol. Otros "inmunomoduladores" que pueden incluirse en la vacuna incluyen, por ejemplo, una o más interleucinas, interferones, u otras citocinas o quimiocinas conocidas. En una realización, el adyuvante puede ser un derivado de ciclodextrina o un polímero polianiónico, tal como los que se describen en las patentes de los Estados Unidos con números 6.165.995 y 6.610.310, respectivamente. Ha de entenderse que el inmunomodulador y/o adyuvante que va a usarse dependerá del sujeto al que la vacuna o composición inmunogénica se administrará, la vía de inyección y el número de inyecciones que van a darse.

[0097] "Enfermedad invasiva" por S. aureus es el aislamiento de bacterias a partir de un sitio normalmente estéril, en el que están asociados signos/síntomas clínicos de enfermedad. Los sitios del organismo normalmente estériles incluyen sangre, LCR, fluido pleural, fluido

pericárdico, fluido peritoneal, fluido articular/sinovial, hueso, sitio interno del organismo (ganglio linfático, cerebro, corazón, hígado, bazo, fluido vítreo, riñón, páncreas, ovario), u otros sitios normalmente estériles. Las afecciones clínicas que caracterizan a las enfermedades invasivas incluyen bacteriemia, neumonía, celulitis, osteomielitis, endocarditis, choque septicémico y más.

[0098] La expresión "aislado" quiere decir que el material se retira de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural si se produce de manera natural o a partir del organismo de su huésped si éste es una entidad recombinante, o se lleva de un entorno a un entorno diferente). Por ejemplo, una proteína, péptido o polisacárido de cápsula "aislado" está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes en la célula o fuente de tejido de la que se deriva la proteína, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente, o de otro modo presente en una mezcla como parte de una reacción química. En la presente invención, las proteínas o polisacáridos pueden aislarse a partir de la célula bacteriana o a partir del residuo celular, de tal modo que se proporcionan en una forma útil en la fabricación de una composición inmunogénica. La expresión "aislado" o "aislar" puede incluir purificar, o purificación, incluyendo por ejemplo, los procedimientos de purificación de las proteínas o polisacáridos capsulares, tal como se describe en el presente documento. La expresión "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de un polipéptido/proteína en las que el polipéptido/proteína se separa de los componentes celulares de las células de las que se aísla o se produce de forma recombinante. Por lo tanto, un polisacárido de cápsula, proteína o péptido que está sustancialmente libre de

117

material celular incluye preparaciones del polisacárido de cápsula, proteína o péptido que tiene menos de aproximadamente un 30 %, un 20 %, un 10 %, un 5 %, un 2,5 %, o un 1 %, (en peso seco) de proteína o polisacárido u otro material celular contaminante. Cuando el polipéptido/proteína se produce de forma recombinante, está también preferentemente sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente un 20 %, un 10 %, o un 5 % del volumen de la preparación de proteína. Cuando el polipéptido/proteína o polisacárido se produce mediante síntesis química, está preferentemente sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos, es decir, se separa de precursores químicos u otros productos químicos que están implicados en la síntesis de la proteína o polisacárido. Por consiguiente, tales preparaciones del polipéptido/proteína o polisacárido tienen menos de aproximadamente un 30 %, un 20 %, un 10 %, un 5 % (en peso seco) de precursores químicos o compuestos distintos del fragmento de polipéptido/proteína o polisacárido de interés.

[0099] Una "sustitución de aminoácidos no conservativa" se refiere a la sustitución de uno o más de los residuos de aminoácido de una proteína con otros residuos de aminoácido que tienen propiedades físicas y/o químicas diferentes, usando las características que se definen anteriormente.

[0100] La expresión "portador farmacéuticamente aceptable" quiere decir un portador aprobado por una agencia de regulación de un gobierno estatal, uno Federal, u otra agencia de regulación, o que se enumera en la Farmacopea de los Estados Unidos o en otra farmacopea reconocida en general para su uso en animales, incluyendo seres humanos así como

mamíferos no humanos. La expresión "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el que se administra la composición farmacéutica. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tal como agua y aceites, incluyendo los de petróleo, animal, vegetal o de origen sintético. Pueden emplearse como portadores líquidos agua, soluciones salinas y dextrosa en solución acuosa y disoluciones de glicerol, en particular para disoluciones inyectables. Excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, carbón, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, puede contener también unas cantidades minoritarias de agentes de humectación, de carga, emulsionante, o agentes de tamponamiento de pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de disoluciones, suspensiones, emulsión, formulaciones de liberación sostenida y similares. Ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin. La formulación ha de adecuarse al modo de administración.

[0101] Las expresiones "proteína", "polipéptido" y "péptido" se refieren a un polímero de residuos de aminoácido y no se imitan a una longitud mínima del producto. Por lo tanto, péptidos, oligopéptidos, dímeros, multímeros, y similares, se incluyen dentro de la definición. Tanto las proteínas de longitud total como los fragmentos de las mismas están englobados en la definición. Las expresiones también incluyen modificaciones, tal como deleciones, adiciones y sustituciones (en general de naturaleza conservativa, pero que

pueden ser no conservativas), con respecto a una secuencia nativa, preferentemente de tal modo que la proteína mantenga la capacidad para provocar una respuesta inmunológica dentro de un animal al que se administra la proteína. También se incluyen modificaciones posteriores a la expresión, por ejemplo, glicosilación, acetilación, lipidación, fosforilación y similares.

[0102] Una respuesta inmunitaria "de protección" se refiere a la capacidad de una composición inmunogénica para provocar una respuesta inmunitaria, o bien mediada de forma celular o bien humoral, que sirve para proteger al sujeto frente a una infección. La protección que se prevé no ha de ser absoluta, es decir, la infección no ha de evitarse o erradicarse totalmente, si hay una mejora estadísticamente significativa en comparación con una población de control de sujetos, por ejemplo, animales infectados a los que no se administró la vacuna o composición inmunogénica. La protección puede limitarse a mitigar la gravedad o rapidez de aparición de los síntomas de la infección. En general, una "respuesta inmunitaria de protección" incluiría la inducción de un aumento en los niveles de anticuerpos específicos para un antígeno particular en al menos un 50 % de los sujetos, incluyendo un cierto nivel de respuestas de anticuerpos funcionales medibles para cada antígeno. En situaciones particulares, una "respuesta inmunitaria de protección" podría incluir la inducción de un aumento del doble en los niveles de anticuerpos o de un aumento de cuatro veces en los niveles de anticuerpos específicos para un antígeno particular en al menos un 50 % de los sujetos, incluyendo un cierto nivel de respuestas de anticuerpos funcionales medibles para cada antígeno. En ciertas realizaciones, la

opsonización de anticuerpos está relacionada con una respuesta inmunitaria de protección. Por lo tanto, la respuesta inmunitaria de protección puede someterse a ensayo midiendo la disminución en porcentaje en el recuento de bacterias en un ensayo de opsonofagocitosis, por ejemplo, los que se describen a continuación. Preferentemente, hay una disminución en el recuento de bacterias de al menos un 10 %, un 25 %, un 50 %, un 65 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o más.

[0103] La expresión "recombinante", tal como se usa en el presente documento, se refiere simplemente a cualquier proteína, polipéptido, o célula que expresa un gen de interés que se produce mediante procedimientos de ingeniería genética. La expresión "recombinante" tal como se usa con respecto a una proteína o polipéptido, quiere decir un polipéptido que se produce mediante expresión de un polinucleótido recombinante. Las proteínas que se usa en las composiciones inmunogénicas de la invención pueden aislarse a partir de una fuente natural o producirse mediante procedimientos de ingeniería genética, tal como, por ejemplo, ClfA recombinante, ClfB recombinante o MntC recombinante. "Recombinante", tal como se usa en el presente documento, describe adicionalmente una molécula de ácido nucleico, que, en virtud de su origen o manipulación, no está asociada con la totalidad o una parte del polinucleótido con el que ésta está asociada por naturaleza. La expresión "recombinante" tal como se usa con respecto a una célula huésped quiere decir una célula huésped en el interior de la que se ha introducido un polinucleótido recombinante.

[0104] ClfA recombinante (rClfA) y ClfB recombinante (rClfB), tal como se usa en el presente documento, se refiere a formas de ClfA o ClfB para su

119

uso en las composiciones inmunogénicas de la invención. En una realización, rClfA es un fragmento de ClfA que comprende uno o más de los dominios N, por ejemplo, N1N2N3, N2N3, N2 o N3 y al se hace referencia a en el presente documento como "ClfA recombinante" o "rClfA". En una realización, rClfB es un fragmento de ClfB que comprende uno o más de los dominios N de ClfB, por ejemplo, N1N2N3, N2N3, N2 o N3 y al se hace referencia a en el presente documento como "ClfB recombinante" o "rClfB".

[0105] La expresión "sujeto" se refiere a un mamífero, pájaro, pez, reptil, o cualquier otro animal. La expresión "sujeto" también incluye seres humanos. La expresión "sujeto" también incluye mascotas domésticas. Unos ejemplos no limitantes de mascotas domésticas incluyen: perros, gatos, cerdos, conejos, ratas, ratones, gerbos, hámsteres, cobayas, hurones, pájaros, serpientes, lagartos, peces, tortugas, y ranas. La expresión "sujeto" también incluye animales de ganado. Unos ejemplos no limitantes de animales de ganado incluyen: alpaca, bisonte, camello, ganado bovino, ciervo, cerdos, caballos, llamas, mulas, burros, ovejas, cabras, conejos, reno, yak, gallinas, gansos, y pavos.

[0106] Tal como se usa en el presente documento, "tratamiento" (incluyendo variaciones del mismo, por ejemplo, "tratar" o "tratado") se refiere a uno o más cualquiera de lo siguiente: (i) la prevención de infección o reinfección, como en una vacuna tradicional, (ii) la reducción en la gravedad de, o, en la eliminación de síntomas, y (iii) la eliminación sustancial o completa del patógeno o trastorno en cuestión. Por lo tanto, el tratamiento puede efectuarse de forma profiláctica (antes de la infección) o terapéuticamente (tras la infección). En la presente invención pueden usarse tratamientos

profilácticos o terapéuticos. De acuerdo con una realización particular de la presente invención, se proporcionan composiciones y procedimientos que tratan, incluyendo inmunizar de forma profiláctica y/o terapéutica, un huésped animal frente a una infección microbiana (por ejemplo, una bacteria tal como especies de Staphylococcus). Los procedimientos de la presente invención son útiles para conferir inmunidad profiláctica y/o terapéutica a un sujeto. Los procedimientos de la presente invención pueden también ponerse en práctica en sujetos para aplicaciones de investigación biomédica.

[0107] Las expresiones "vacuna" o "composición de vacuna", que se usan de forma intercambiable, se refieren a composiciones farmacéuticas que comprenden al menos una composición inmunogénica que induce una respuesta inmunitaria en un animal.

Descripción general

[0108] La presente invención se refiere a composiciones inmunogénicas que comprenden al menos tres antígenos a partir de un organismo estafilocócico, por ejemplo, S. aureus. Los antígenos pueden aislarse a partir del organismo usando procedimientos de aislamiento bioquímicos, o éstos pueden producirse de forma sintética o por medios recombinantes. Los antígenos pueden ser polipéptidos, o polisacáridos, o una combinación de los mismos. Estas composiciones inmunogénicas pueden usarse en la fabricación de una vacuna para inmunizar sujetos frente a infecciones causadas por un organismo estafilocócico. Los componentes adecuados para su uso en estas composiciones se describen en mayor detalle a continuación.

Composiciones inmunogénicas estafilocócicas

[0109] S. aureus es el agente causante de una amplia variedad de enfermedades humanas variando de infecciones superficial de la piel a afecciones potencialmente mortales tal como neumonía, septicemia y endocarditis. Véase Lowy N. Eng. J. Med. 339:580 a 532(1998). En cases de enfermedad invasiva, S. aureus puede aislarse a partir de los sitios del organismo normalmente estériles incluyendo sangre, líquido cefalorraquídeo LCR, fluido pleural, fluido pericárdico, fluido peritoneal, fluido articular/sinovial, hueso, sitio interno del organismo (ganglio linfático, cerebro, corazón, hígado, bazo, fluido vítreo, riñón, páncreas, ovario), u otros sitios normalmente estériles. Esto puede conducir a afecciones clínicas potencialmente mortales tal como bacteriemia, neumonía, celulitis, osteomielitis, endocarditis, y choque septicémico. La mayoría de adultos, ancianos y pacientes de pediatría corre riesgo de infecciones por S. aureus.

[0110] Las realizaciones de la presente invención describen antígenos seleccionados en composiciones inmunogénicas incluyendo un polipéptido de factor de aglutinación A (ClfA) de S. aureus aislado, un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 5 conjugado con una proteína de portador, un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 8 conjugado con una proteína de portador, un factor de aglutinación B (ClfB) de S. aureus aislado, y proteína MntC de S. aureus recombinante. A continuación, los antígenos se caracterizaron en composiciones inmunogénicas como una serie de combinaciones, para mostrar que unas combinaciones específicas proporcionan respuestas inmunitarias que pueden ser superiores a las que se producen usando componentes individuales para composiciones inmunogénicas. Por consiguiente, una combinación proporciona una

composición inmunogénica que comprende: un polipéptido de factor de aglutinación A (ClfA) de S. aureus aislado, un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 5 conjugado con una proteína de portador, y un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 8 conjugado con una proteína de portador. Una segunda combinación proporciona una composición inmunogénica que comprende: un polipéptido de factor de aglutinación A (ClfA) de S. aureus aislado, un factor de aglutinación B (ClfB) de S. aureus aislado, polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 5 conjugado con una proteína de portador, y un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 8 conjugado con una proteína de portador. Una tercera combinación proporciona una composición inmunogénica que comprende: un polipéptido de factor de aglutinación A (ClfA) de S. aureus aislado, un polipéptido de factor de aglutinación B (ClfB) de S. aureus aislado, una proteína MntC de S. aureus aislada, un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 5 conjugado con una proteína de portador, y un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 8 conjugado con una proteína de portador. Una cuarta combinación proporciona una composición inmunogénica que comprende: un polipéptido de factor de aglutinación A (ClfA) de S. aureus aislado, una proteína MntC de S. aureus aislada, un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 5 conjugado con una proteína de portador, y un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 8 conjugado con una proteína de portador. Una quinta combinación proporciona una composición inmunogénica que comprende: un polipéptido de factor de aglutinación B (ClfB) de S. aureus aislado, un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 5 conjugado con una proteína de

portador, y un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 8 conjugado con una proteína de portador. Una sexta combinación proporciona una composición inmunogénica que comprende: un polipéptido de factor de aglutinación B (ClfB) de S. aureus aislado, una proteína MntC de S. aureus aislada, un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 5 conjugado con una proteína de portador, y un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 8 conjugado con una proteína de portador. Una séptima combinación proporciona una composición inmunogénica que comprende: una proteína MntC de S. aureus aislada, un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 5 conjugado con una proteína de portador, y un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 8 conjugado con una proteína de portador. Una octava combinación proporciona una composición inmunogénica que comprende: un polipéptido de factor de aglutinación A (ClfA) de S. aureus aislado, un polipéptido de factor de aglutinación B (ClfB) de S. aureus aislado, y una proteína MntC de S. aureus aislada. En algunas realizaciones, las combinaciones anteriores comprenden además al menos uno de los siguientes antígenos: EkeS, DsqA, KesK, KrkN, KrkN2, RkaS, RrkN, KnkA, SdrC, SdrD, SdrE, Opp3a, DltD, HtsA, LtaS, IsdA, IsdB, IsdC, SdrF, SdrG, SdrH, SrtA, SpA, Sbi alfa-hemolisina (hla), beta-hemolisina, proteína A de unión a fibronectina (fnbA), proteína B de unión a fibronectina (fnbB), coagulasa, Fig, map, leucocidina Panton-Valentine (pvl), alfa-toxina y sus variantes, gamma-toxina (hlg) y variantes, ica, transportador ABC inmunodominante, transportador Mg2+, transportador ABC de Ni, RAP, autolisina, receptores de laminina, IsaA/PisA, IsaB/PisB, SPOIIIE, SsaA, EbpS, Sas A, SasF, SasH, EFB (FIB), SBI, Npase, EBP, sialoproteína II de

unión a hueso, precursor de aureolisina (AUR)/Sepp1, Cna, y fragmentos de los mismas tal como M55, TSST-1, mecA, poli-N-acetilglucosamina (PNAG/dPNAG) exopolisacárido, GehD, EbhA, EbhB, SSP-1, SSP-2, HBP, proteína de unión a vitronectina, HarA, EsxA, EsxB, Enterotoxina A, Enterotoxina B, Enterotoxina C1, y autolisina novedosa.

[0111] Estudios epidemiológicos de brotes de S. aureus indican que la evolución de S. aureus es clonal por naturaleza, en la que un único clon que ha adquirido un genotipo satisfactorio se ha propagado con rapidez y ha dado lugar a muchas de las infecciones. Por lo tanto, se considera que la evolución es clonal. El genoma bacteriano está compuesto por un más grande genoma del núcleo de la especie más estable y un conjunto más diversificado de genes auxiliares. Véase Feil y col., Nature Reviews: Microbiology 2:483 a 495 (2004). Los genes del núcleo están presentes de forma ubicua en todos los clones de las especies, y los genes auxiliares no están presentes necesariamente en cualquier clon dado. Considerando S. aureus, un estudio usando una micromatriz de ADN que representa más de 90 un % del genoma de S. aureus encontró que un 78 % de los genes en el genoma era común a todos los S. aureus representando de este modo el "núcleo de la especie", y el 22 % restante son los "genes auxiliares". Los genes auxiliares comprenden un material genético prescindible, gran parte del cual codifica para factores de virulencia, resistencia a antibióticos mediada por proteínas y genes que codifican para proteínas específicas para interactuar con un entorno de huésped particular. Véase Fitzgerald y col., PNAS 98:8821 a 8826 (2001); Feil y col., Nature Reviews: Microbiology 2:483 a 495 (2004). En general, los genes del núcleo están evolucionando

122

más lentamente y los genes auxiliares son polimórficos. Véase Kuhn y col., J. Bact. 188:169 a 178 (2006). Por lo tanto, unos genes del núcleo seleccionados apropiadamente proporcionan unos antígenos diana mejores para su uso en composiciones inmunogénicas para evitar infecciones.

[0112] Antígenos expresados en superficie a partir de aislados causantes de enfermedades o tipos clonales de S. aureus ofrecen una fuente de antígenos capaz de inducir inmunidad y anticuerpos funcionales. En el nivel macromolecular (secuencia o bien de aminoácido o bien de polisacárido), formas conservadas del antígeno expresadas mediante los diferentes aislados de enfermedad pueden elegirse para permitir una amplia reactividad cruzada de anticuerpos a aquellas cepas que pueden presentar variaciones antigénicas de la vacuna diana.

[0113] Una consideración importante para incluir un antígeno en las composiciones inmunogénicas multiantígeno que se describen en el presente documento es si el antígeno ha mostrado eficacia cuando se administra como una composición inmunogénica proporcionando protección en uno o más modelos animales de infección bacteriana. Hay numerosos modelos animales para varias enfermedades por S. aureus. Cada uno de estos modelos tiene putos fuertes y débiles.

[0114] El aclaramiento humano de infecciones bacterianas puede proceder a través de destrucción opsónica que está mediada después de la captación por fagocitos. Hay muchos ejemplos convincentes de esto a partir de estudios que usan antígenos de polisacárido Gram positivos, tal como polisacárido capsular Streptococcus pneumoniae y polisacárido capsular de S. aureus. Véase Lee y col., Crit. Rev. Micro. 29:333 a 349 (2003). Hay

menos evidencia de actividad opsónica que se induce mediante antígenos proteicos Gram positivos. La captación por fagocitos se ha observado, pero la destrucción directa ha resultado más difícil de mostrar. Se ha mostrado que los anticuerpos monoclonales frente a proteínas confieren protección frente a exposición de S. aureus en modelos animales de infección; y mecanismos diferentes de destrucción opsonofagocítica puede tener en cuenta la protección observada.

[0115] La inducción de anticuerpos que tiene una actividad funcional medible, tal como actividad opsonofagocítica (OPA) es un indicador de si un antígeno particular es útil para la inclusión en las composiciones inmunogénicas de la presente invención. Otros indicadores incluyen pero sin limitarse a expresión de antígeno en la superficie celular durante la expresión *in vivo* tal como se mide usando anticuerpos especificos de antígeno o la capacidad de los anticuerpos para inhibir/neutralizar función antigénica.

Especies/ cepas

[0116] El tipo de cualquier particular hospital o cepa de enfermedad es útil para determinar el origen, el grado de relación clonal y la supervisión de la epidemiología de los brotes. Numerosos procedimientos están disponibles para el timado de cepas de S. aureus. La definición práctica clásica para una especie bacteriana es un grupo de cepas que se caracterizan por mas de un 70 % de hibridización genómica (hibridización genómica ADN-ADN de DDH) y más de un 97 % de identidad de secuencia de gen de ARN ribosómico 16S. Véase Vandamme y col., Microbiol. Rev. 60:407 a 438 (1996). El tipado bacteriófago (BT) es un procedimiento de tipado de cepas de S. aureus en

123

base a su susceptibilidad a lisis por ciertos tipos de fago. Véase Blair y col., Bull. W.H.O. 24:771 a 784 (1961). Este procedimiento antiguo adolece de una falta de reproducibilidad entre laboratorios y un fallo de un 15 a un 20 % al tipar aislados.

Composiciones inmunogénicas de antígeno único frente a multiantígeno

[0117] Surge la pregunta de si la composición inmunogénica óptima para proteger frente a una infección de las cepas de S. aureus predominantes debería de estar compuesta por un único componente o múltiples componentes. Numerosos estudios han mostrado que unas composiciones inmunogénicas en base a una única proteína o componente de carbohidrato puede ofrecer alguna protección frente a exposición a una cepa de S. aureus que expresa ese componente en ciertos modelos animales. Es importante destacar que, se ha mostrado también que la protección frente a un único antígeno puede depender de la cepa seleccionada.

[0118] Se han investigado proteínas de superficie, tal como adhesinas, como vacunas de único componente. Por ejemplo, ratones inmunizados con ClfA de S. aureus desarrollaron una artritis menos severa que los ratones con una proteína de control. Véase Josefsson y col., J. Infect. Dis. 184:1572 a 1580 (2001). Fragmentos de la adhesina de unión a colágeno (cna) ofrecieron protección en un modelo de septicemia de ratón. Véase Nilsson, y col., J. Clin. Invest., 101:2640 a 2649 (1998). La inmunización de ratones con el dominio A de ClfB podría reducir la colonización nasal en un modelo de ratón. Véase Schaffer y col., Infect. Immun. 74:2145 a 2153 (2006).

[0119] Una de las catorce proteínas de secuestro de hierro de S. aureus conocidas como IsdB se está investigando en una formulación inmunogénica

monovalente para protección frente a infección por S. aureus. Esta proteína ha mostrado un buen efecto de protección en ratones y una buena inmunogenicidad en primates no humanos. Véase Kuklin y col., Infect. Immun. 74:2215 a 2223 (2006).

[0120] Debido al vasto potencial de S. aureus para evolucionar o sustituir a diferentes proteínas para realizar las msimas o similares funciones, la formulación inmunogénica óptima para proteger la mayor cantidad de personas frente a la mayor cantidad de enfermedades por S. aureus es una formulación multiantígeno que comprende 2 o más (por ejemplo, 3, 4, 5, etc.) antígenos adecuadamente seleccionados y presentados en una formulación inmunogénica. En ciertas realizaciones, una composición inmunogénica de la invención comprende tres o más antígenos que se seleccionan de un polipéptido de factor de aglutinación A (ClfA) de S. aureus aislado, un polipéptido de factor de aglutinación B (ClfB) de S. aureus aislado, un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 5 (CP5) conjugado con una proteína de portador, un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 8 (CP8) conjugado con una proteína de portador y una proteína MntC de S. aureus aislada. En ciertas realizaciones, una composición inmunogénica de la invención comprende cuatro o más antígenos que se seleccionan de un polipéptido de factor de aglutinación A (ClfA) de S. aureus aislado, un polipéptido de factor de aglutinación B (ClfB) de S. aureus aislado, un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 5 (CP5) conjugado con una proteína de portador, un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 8 (CP8) conjugado con una proteína de portador y una proteína MntC de S. aureus aislada. En ciertas realizaciones, una composición inmunogénica

124

de la invención comprende un polipéptido de factor de aglutinación A (ClfA) de S. aureus aislado, un polipéptido de factor de aglutinación B (ClfB) de S. aureus aislado, un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 5 (CP5) conjugado con una proteína de portador, un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 8 (CP8) conjugado con una proteína de portador y una proteína MntC de S. aureus aislada como antígenos.

Adyuvantes

[0121] Composiciones inmunogénicas tal como se describe en el presente documento también comprenden, en ciertas realizaciones, uno o más adyuvantes. Un adyuvante es una sustancia que aumenta la respuesta inmunitaria cuando se administra junto con un inmunógeno o antígeno. Se ha mostrado que un número de citocinas o linfocinas tienen una actividad de modulación inmunitaria, y por lo tanto son útiles como adyuvantes, incluyendo, pero sin limitarse a, las interleucinas 1-α, 1-β, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos con n.° 5.723.127), 13, 14, 15, 16, 17 y 18 (y sus formas mutantes); los interferones-α, β y γ; factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-LCR) (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos con n.° 5.078.996 y número de Registro de ATCC 39900); factor de estimulación de colonias de macrófagos (M-LCR); factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-LCR); y los factores de necrosis tumoral α y β. Aún otros adyuvantes que son útiles con las composiciones inmunogénicas que se describen en el presente documento incluyen quimiocinas, incluyendo sin limitación, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, y RANTES; moléculas de adhesión, tal como una selectina, por ejemplo, L-selectina, P-selectina y E-selectina; moléculas de tipo mucina,

por ejemplo, CD34, GlycAM-1 y MadCAM-1; un miembro de la familia de las integrinas tal como LFA-1, VLA-1, Mac-1 y p150.95; un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas tal como PECAM, ICAMs, por ejemplo, ICAM-1, ICAM-2 y ICAM-3, CD2 y LFA-3; moléculas coestimuladoras tal como B7-1, B7-2,CD40 y CD40L; factores de crecimiento incluyendo el factor de crecimiento vascular, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento epidérmico, PDGF, BL-1, y factor de crecimiento endotelial vascular; moléculas de receptor incluyendo Fas, receptor de TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, y DR6; y caspasa (ICE).

[0122] Adyuvantes adecuados que se usan para aumentar una respuesta inmunitaria incluyen adicionalmente, sin limitación, MPL™ (lípido monofosforílico 3-O-desacilado A, Corixa, Hamilton, MT), que se describe en la patente de los Estados Unidos con n.° 4.912.094. También son adecuados para su uso como adyuvantes, análogos de lípido A de síntesis o compuestos de fosfato de aminoalquilglucosamina (AGP), o derivados o análogos de los mismos, que están disponibles a través de Corixa (Hamilton, MT), y que se describen en la patente de los los Estados Unidos con n.° 6.113.918. Un AGP de este tipo es 2-[(R)-3-tetradecanoiloxi-tetradecanoil-amino] etil 2-desoxi-4-O-fosfono-3-O-[(R)-3-tetra-decanoioxi-tetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoiloxi-tetradecanoil-amino]-b-D-glucopiranósido, que se conoce también como 529 (anteriormente conocido como RC529). Este adyuvante 529 se formula como una forma acuosa (AF) o como una emulsión estable (SE).

125

[0123] Aún otros adyuvantes incluyen péptidos de muramilo, tal como N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanina-2-(1'-2' dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxi-fosforil-oxi)-etilamina (MTP-PE); emulsiones de aceite en agua, tal como MF59 (patente de los Estados Unidos con n.° 6.299.884) (que contiene un 5 % de escualeno, un 0,5 % de polysorbate 80, y un 0,5 % de Span 85 (que opcionalmente contiene varias cantidades de MTP-PE) que se formulan para dar partículas submicrométricas usando un microfluidizador tal como el microfluidizador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA)), y SAF (que contiene un 10 % de escualeno, un 0,4 % de polysorbate 80, un 5 % de polímero L121 bloqueado con Pluronic, y thr-MDP, o bien microfluidizado para dar una emulsión submicrométrica o bien mediante agitación con vórtex para generar una emulsión de tamaño de partícula más grande); adyuvante de Freund incompleto (IFA); sales de aluminio (alumbre), tal como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio; Amphigen; Avridine; L121/escualeno; D-lactida-polilactida/glicósido; polioles de Pluronic; Bordetella inactivada; saponinas, tal como Stimulon™ QS-21 (Antigenics, Framingham, MA.), que se describen en la patente de los Estados Unidos con n.° 5.057.540, ISCOMATRIX (CSL Limited, Parkville, Australia), que se describe en la patente de los Estados Unidos con n.° 5.254.339, y complejos inmunoestimulantes (ISCOMATRIX); tuberculosis por Mycobacterium; lipopolisacáridos bacterianos; polinucleótidos de síntesis tales como oligonucleótidos con contenido en un motivo de CpG (por ejemplo, la patente de los Estados Unidos con n.° 6.207.646); IC-31 (Intercell AG, Viena, Austria), que se describe en European patente n.ºs 1.296.713 y 1.326.634;

una toxina de tos ferina (PT) o una mutante de la misma, una toxina de cólera o una mutante de la misma (por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos con n.ºs 7.285.281, 7.332.174, 7.361.355 y 7.384.640); o an E. coli heat-labile toxina (LT) o una mutante de la misma, en particular LT-K63, LT-R72 (por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos con n.ºs 6.149.919, 7.115.730 y 7.291.588).

Antígenos candidatos:

ClfA: Organización de dominio

[0124] El factor de aglutinación A (ClfA) es una proteína de superficie de S. aureus asociada con la unión a proteínas de matriz de huésped a través de un sitio de unión a fibrinógeno. ClfA es un miembro de una familia de proteínas con contenido en el motivo LPXTG (SEQ ID n.º: 125) de carboxilo terminal que permite que la proteína se enlace covalentemente con la superficie celular. ClfA también pertenece a otra familia de proteínas (Componentes superficiales microbianos que reconocen las moléculas adhesivas de la matriz, o MSCRAMM) que se asocian con las proteínas de huésped de unión tal como fibrinógeno (unido mediante ClfA), las proteínas de unión a fibronectina (FnbA y FnbB), la proteína de unión a colágeno (Cna) y otras. Todas estas proteínas comparten la secuencia señal de amino terminal que media el transporte a la superficie celular. Las MSCRAMM también incluyen un dominio A que es la región funcional con contenido en el sitio activo para unión a ligandos (por ejemplo, fibrinógeno, fibronectina, elastina, queratina). El dominio A va seguido por una región que está compuesta por repeticiones de serina-aspartato (repetición de SD), que se piensa que abarca la capa de peptidoglicano. La repetición de SD va

126

seguida por una región de extensión de membrana que incluye el motivo LPXTG (SEQ ID n.º: 125) para enlace covalente de la proteína a peptidoglicano. ClfA se describe en la patente de los Estados Unidos con n.º 6.008.341.

[0125] La región de unión a ligandos de ClfA que comprende N1N2N3 del dominio A (figura 1) abarca los aminoácidos 40 a 559. Los dominios N de ClfA se han asignado tal como sigue: N1 engloba los residuos 45 a 220; N2 engloba los residuos 229 a 369; y N3 engloba los residuos 370 a 559. Véase Deivanayagam y col. EMBO J. 21:6660 a 6672 (2002). Para facilidad de referencia puede hacerse referencia a los dominios de N1N2N3 como N123, de forma similar puede hacerse referencia a N2N3 como N23. En preparaciones de N1N2N3 recombinante, se ha encontrado que el dominio de N1 es sensible a proteasa y se escinde o hidroliza fácilmente para dejar el N2N3 como un fragmento recombinante de unión a ligandos estable. Véase Deivanayagam y col. EMBO J. 21:6660 a 6672 (2002). La estructura de cristal del fragmento de N2N3 de unión a fibrinógeno de dominio A de ClfA, reveló que tanto N2 como N3 están dominados mediante cadenas beta antiparalelas. Además de las cadenas beta antiparalelas, el dominio de N2 contiene una hélice alfa de vuelta única y dos hélices 310 y el dominio de N3 contiene tres hélices 310. Véase Deivanayagam y col. EMBO J. 21:6660 a 6672 (2002). El alineamiento de secuencia de N2 y N3 revela sólo un 13 % de identidad de secuencia y un 36 % de similitud de secuencia a lo largo de sus longitudes. Véase Deivanayagam y col. EMBO J. 21:6660 a 6672 (2002). La topología de los dominios de N2 y de N3 es similar al clásico

pliegue de IgG y se ha propuesto que sean variantes novedosas del pliegue de IgG. Véase Deivanayagam y col. EMBO J. 21:6660 a 6672 (2002).

Secuencia de ClfA

[0126] El gen para la proteína de factor de aglutinación A, designada ClfA, se ha clonado, secuenciado y analizado en detalle a nivel molecular (McDevitt y col., Mol. Microbiol. 11: 237 a 248 (1994); McDevitt y col., Mol. Microbiol. 16:895 a 907 (1995)). Los identificadores de secuencia para las secuencias de aminoácidos de ClfA a partir de 111 aislados causantes de enfermedades de S. aureus se muestran en la tabla 10. La secuencia de aminoácidos de la longitud total del ClfA silvestre (incluyendo la secuencia señal) a partir de la cepa de S. aureus PFESA0237, se muestra en el SEQ ID n.º: 130. Esta secuencia muestra una tirosina en la posición 338, que se cambia a una alanina en la forma mutada de ClfA. La longitud total del gen que codifica el ClfA silvestre a partir de la cepa de S. aureus PFESA0237, que comprende la región de N123, la región de repetición y la región de anclaje se muestra en el SEQ ID n.º: 131. La secuencia de aminoácidos de las formas mutadas de Y338A de ClfA se muestran en el SEQ ID n.º: 123. No obstante, ha de observarse que el cambio de una tirosina a una alanina, que tiene lugar en el ClfA silvestre en la posición 338 de SEQ ID n.º: 130, y que se designa como Y338A, se muestra en la forma mutada de ClfA, en el SEQ ID n.º: 123 en la posición 310. Además, la forma mutada de ClfA que se muestra en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º: 123 es la forma adulta de ClfA sin la secuencia señal, teniendo en cuenta de este modo la diferencia en cuanto a la posición de esta mutación entre el SEQ ID n.º: 130 y el SEQ ID n.º: 123.

ClfB: Organización de dominio

127

[0127] ClfB es una proteína de S. aureus que tiene actividad de unión a fibrinógeno y desencadena que S. aureus forme grupos en presencia de plasma. ClfB es una proteína de MSCRAMM y muestra la organización de dominio de MSCRAMM característica incluyendo un dominio A que es la región funcional con contenido en el sitio activo para unión a ligandos (por ejemplo, fibrinógeno, fibronectina, elastina, queratina). El dominio A va seguido por una región que está compuesta por repeticiones de serina-aspartato (repetición de SD), que se piensa que abarca la capa de peptidoglicano. La repetición de SD va seguida por una región de extensión de membrana que incluye el motivo LPXTG (SEQ ID n.º: 125) para enlace covalente de la proteína a peptidoglicano. ClfB se describe en el documento WO 99/27109 y en la patente de los Estados Unidos 6.680.195.

[0128] The internal organización de ClfB N-terminal dominio A es very similar organización como found en ClfA. El dominio A se compone de tres subdomains N1, N2, y N3. La región de unión a ligandos de ClfB que comprende N1N2N3 del dominio A (figura 1) abarca los aminoácidos 44 a 585. Para facilidad de referencia puede hacerse referencia a los dominios de N1N2N3 como N123, de forma similar puede hacerse referencia a N2N3 como N23. Los dominios N de ClfB se han asignado tal como sigue: N1 engloba los residuos 44 a 197; N2 engloba los residuos 198 a 375; y N3 engloba los residuos 375 a 585. En ClfA, se encontró que la estructura de cristal del dominio A tiene una única versión del pliegue de inmunoglobulina y por analogía puede especularse que el caso para ClfB es el mismo. Véase Deivanayagam y col., EMBO J. 21:6660 a 6672 (2002). Incluso a pesar de que la organización de los dominios A de ClfB y ClfA es similar, la identidad

de secuencia es sólo de un 26 %. Véase Ni Eidhin y col., Mol. Microbiol. 30:245 a 257 (2002).

Secuencia de ClfB

[0129] El gen que codifica ClfB se clasifica como un gen de adhesión de núcleo. Las secuencias de ClfB a partir de 92 cepas de S. aureus asociadas con múltiples estados de enfermedad se resumen en la tabla 11. Secuencias adicionales se obtuvieron a partir de GenBank.

Otras MSCRAMM

[0130] Otras MSCRAMM pueden considerarse para su uso en una composición inmunogénica de la presente invención. Por ejemplo, las proteínas de repetición de serina-aspartato (Sdr), SdrC, SdrD, y SdrE están relacionadas en secuencia primario y organización estructural con las proteínas de ClfA y ClfB y se encuentran en la superficie celular. Las proteínas SdrC, SdrD y SdrE son proteínas asociadas a la pared celular, que tienen una secuencia señal en el N-terminal y un motivo LPXTG (SEQ ID n.º:125), residuos con carga positiva y dominio hidrófobo en el C-terminal. Cada una también tiene una repetición de SD con contenido en región R de suficiente longitud para permitir, junto con los motivos B, una expresión eficiente de la región A de dominio de unión a ligandos en la superficie celular. Con la región A de las proteínas SdrC, SdrD y SdrE ubicadas en la superficie celular, las proteínas pueden interactuar con proteínas en plasma, la matriz extracelular o con moléculas en la superficie de las células huésped. Las proteínas Sdr comparten cierta similitud de secuencia de aminoácidos limitada con ClfA y ClfB. Como ClfA y ClfB, SdrC, SdrD y SdrE

128

también exhiben una unión a ligandos dependiente de catión de las proteínas de matriz extracelular.

[0131] Los genes sdr están unidos muy próximamente y organizados en tándem. Las proteínas Sdr (de SdrC, SdrD, SdrE, ClfA, y ClfB) comprenden característicamente una región A en la que hay una secuencia de aminoácidos muy conservada que puede usarse para derivar un motivo TYTFTDYVD (SEQ ID n.º: 126) de consenso. El motivo exhibe una ligera variación entre las diferentes proteínas. Esta variación, junto con la secuencia de consenso del motivo se describe en la patente de los Estados Unidos con número 6.680.195. En el proteínas Clf-Sdr, este motivo está muy conservado. El motivo puede usarse en composiciones inmunogénicas para impartir una inmunidad de amplio espectro frente a infecciones bacterianas, y también puede usarse como un antígeno en la producción de anticuerpos monoclonales o policlonales. Un anticuerpo de este tipo puede usarse para impartir una inmunidad pasiva de amplio espectro.

[0132] Las proteínas Sdr se diferencian de ClfA y ClfB en que tienen de dos a cinco secuencias repetidas de residuo (motivos B) adicionales 110 a 113 ubicadas entre la región A y la región R. Cada motivo B contiene un bucle de mano EF de unión de Ca2+ de consenso que se encuentra normalmente en las proteínas eucarióticas. Se mostró que La integridad estructural de una proteína recombinante que comprende las cinco repeticiones B de SdrD mediante análisis de fluorescencia bisANS dependía de Ca2+, lo que sugería que las manos EF son funcionales. Cuando se eliminó el Ca2+, la estructura se hundió a una conformación sin plegar. La estructura original se restauró mediante la adición de Ca2+. Los dominios de R de C-terminal de

las proteínas Sdr contienen de 132 a 170 SD residuos. Éstos van seguidos de regiones de anclaje a pared conservadas características de muchas proteínas de superficie de bacterias Gram positivas.

[0133] En las proteínas Sdr y Clf, este motivo B está muy conservado mientras que una versión degenerada tiene lugar en MSCRAMM de unión a fibronectina, así como en la proteína de unión a colágeno Cna. Los motivos B, en conjunción con las regiones R, son necesarias para mostrar el dominio de unión a ligando a una cierta distancia con respecto a la superficie celular. Los motivos B repetidos son un denominador común del grupo secundario de las proteínas de repetición de SD que se describen en el presente documento. Estos motivos se encuentran en diferentes números en las tres proteínas Sdr a partir de la cepa PFESA0237. Hay unas distinciones claras entre los motivos B individuales. Las unidades más conservadas son las que se encuentra adyacentes a las regiones R (SdrC B2, SdrD B5 y SdrE B3). Éstas se diferencian del resto en varios sitios, especialmente en la mitad de C-terminal. Un detalle estructural digno de mención es que las repeticiones B adyacentes están siempre separados por un residuo de prolina presente en la región de C-terminal, pero una prolina nunca tiene lugar entre las últimas repeticiones B y la región R. En su lugar, este ligador se caracteriza por un tramo ácido corto. Estas diferencias son una evidencia de que las unidades de extremo tienen un papel estructural o funcional diferente en comparación con los otros motivos B. Los motivos B de N-terminal de SdrD y SdrE se han separado entre sí, y hay numerosas alteraciones de aminoácido, incluyendo pequeñas inserciones y deleciones mientras que el resto de motivos B

internos están más altamente conservados. Obsérvese que cada una de las tres proteínas Sdr tiene al menos un motivo B de cada tipo.

[0134] Los dominios de R de C-terminal de las proteínas Sdr contienen de 132 a 170 SD residuos. Éstos van seguidos de regiones de anclaje a pared conservadas características de muchas proteínas de superficie de bacterias Gram positivas.

[0135] Otras moléculas de SdrD candidatas pueden derivarse a partir de varias especies de organismos para su uso en una composición inmunogénica de la invención, algunas de las cuales incluyen la siguiente SdrD a partir de S. aureus: cepa USA300 FPR3757 (número de registro de proteína SAUSA300 0547); cepa NCTC8325 (número de registro de proteína SAOUHSC 00545); cepa MW2 (número de registro de proteína MW0517); cepa MSSA476 (número de registro de proteína SAS0520; y cepa Mu50 (número de registro de proteína SAV0562).

[0136] MSCRAMM adicionales que pueden considerarse para su uso en una composición inmunogénica de la presente invención incluyen EkeS, DsqA, KesK, KrkN, KrkN2, RkaS, RrkN, y KnkA. Estas MSCRAMM se describen en el documento WO 02/102829, que se incorpora por la presente por referencia. MSCRAMM adicionales, identificados mediante el n.° de Registro de GenBank, incluyen NP_373261.1, NP_373371.1, NP_374246.1, NP_374248.1, NP_374841.1, NP_374866.1, NP_375140.1, NP_375614.1, NP_375615.1, NP_375707.1, NP_375765.1, y NP_375773.1.

Polisacáridos de cápsula de tipo 5 y tipo 8

[0137] Microorganismos estafilocócicos capaces de dar lugar a enfermedad invasiva en general también son capaces de producción de un polisacárido

de cápsula (CP) que encapsula la bacteria y aumenta su resistencia a aclaramiento por el sistema inmunitario innato del huésped. El CP sirve para cubrir la célula bacteriana en una cápsula de protección que hace las bacterias resistentes a fagocitosis y a destrucción intracelular. Las bacterias carentes de una cápsula son más susceptibles de fagocitosis. Los polisacáridos capsulares son con frecuencia un importante factor de virulencia para muchos patógenos bacterianos, incluyendo Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae y streptococos del Grupo B.

[0138] El polisacárido de cápsula puede usarse para realizar un serotipado de una especie particular de bacterias. El tipado se lleva a cabo normalmente mediante reacción con un anticuerpo monoclonal o antisuero específico generado para una estructura específica o un único epítopo característico del polisacárido de cápsula. Las bacterias encapsuladas tienden a crecer en colonias lisas mientras que las colonias de bacterias que han perdido sus cápsulas aparecen rugosas. Las colonias que producen una aparición mucoide se conocen como Muy Encapsuladas. Tipos 1 y 2 de S. aureus son muy encapsuladas y están rara vez asociadas con enfermedad.

[0139] La mayoría de aislados clínicos de S. aureus son encapsuladas con los serotipos o bien 5 o bien 8. Los polisacáridos capsulares de tipo 5 (CP5) y de tipo 8 (CP8) tienen unidades de repetición de trisacárido similares compuestas por ácido N-acetil mannosaminurónico, N-acetil L-fucosamina, y N-acetil D-fucosamina. Véase Fournier, J.M. y col., Infect. Immun. 45:97 a 93 (1984) y Moreau, M., y col., Carbohidrate Res. 201:285 a 297 (1990). Los dos CP, que tienen los mismos azúcares, pero que se diferencian en los

enlaces de azúcar y en los sitios de O acetilación para producir unos patrones serológicamente diferentes de inmunoreactividad.

[0140] En algunas realizaciones, los polisacáridos capsulares de serotipo 5 y/o 8 de la invención son O-acetilados. En algunas realizaciones, el grado de O-acetilación de oligosacárido o polisacárido capsular de tipo 5 es de un 10 a un 100 %, de un 20 a un 100 %, de un 30 a un 100 %, de un 40 a un 100 %, de un 50 a un 100 %, de un 60 a un 100 %, de un 70 a un 100 %, de un 80 a un 100 %, de un 90 a un 100 %, 50- 90 %, de un 60 a un 90 %, de un 70 a un 90 % o de un 80 a un 90 %. En algunas realizaciones, el grado de O-acetilación de polisacárido capsular de tipo 8 u oligosacárido es de un 10 a un 100 %, de un 20 a un 100 %, de un 30 a un 100 %, de un 40 a un 100 %, de un 50 a un 100 %, de un 60 a un 100 %, de un 70 a un 100 %, de un 80 a un 100 %, de un 90 a un 100 %, de un 50 a un 90 %, de un 60 a un 90 %, de un 70 a un 90 % o de un 80 a un 90 %. En algunas realizaciones, el grado de O-acetilación de los oligosacáridos o polisacáridos capsulares de tipo 5 y tipo 8 es de un 10 a un 100 %, de un 20 a un 100 %, de un 30 a un 100 %, de un 40 a un 100 %, de un 50 a un 100 %, de un 60 a un 100 %, de un 70 a un 100 %, de un 80 a un 100 %, de un 90 a un 100 %, de un 50 a un 90 %, de un 60 a un 90 %, de un 70 a un 90 % o de un 80 a un 90 %.

[0141] El grado de O-acetilación del polisacárido u oligosacárido puede determinarse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, mediante una RMN de protones (Lemercinier y Jones 1996, Carbohidrate Research 296; 83 a 96, Jones y Lemercinier 2002, J Pharmaceutical y Biomedical Analysis 30; 1233 a 1247, documentos WO

05/033148 o WO 00/56357). Otro procedimiento que se usa normalmente se describe por Hestrin (1949) J. Biol. Chem. 180; 249 a 261.

[0142] En algunas realizaciones, los polisacáridos capsulares de serotipo 5 y/o 8 de la invención se usan para generar unos anticuerpos que son funcionales tal como se mide por la destrucción de bacterias en un modelo de eficacia animal o un ensayo de destrucción opsonofagocítica que muestra que los anticuerpos destruyen las bacterias. Tal funcionalidad puede no observarse usando un ensayo que supervisa la generación de anticuerpos únicamente, lo que no es indicativo de la importancia de la O-acetilación en cuanto a la eficacia.

Epidemiología de Cápsula

[0143] La asociación de serotipos de cápsula particulares con enfermedad es posible a través de la supervisión de aislados clínicos. De los ocho serotipos de S. aureus diferentes identificados (Karakawa y Vann (1982) sólo los serotipos 1 y 2 son muy encapsulados, y éstos rara vez están aislados. Véase Capsular Polysaccharides of Staphylococcus aureus, p. 285 a 293, En J. B. Robbins, J. C. Hill y J. C. Sadoff (ed.), Seminars in infectious disease, vol. 4, Bacterial Vaccines. Thieme Stratton, Inc. Nueva York). Los estudios han mostrado que aproximadamente de un 85 a un 90 % de los aislados clínicos de S. aureus expresan CP5 o CP8 (Arbeit RD, y col., Diagn. Microbiol. Infect. Dis. (1984) Apr;2(2):85 a 91; Karakawa WW, y col., J. Clin. Microbiol. (1985) Sep;22(3):445-7; Essawi T, y col., Trop. Med. Int. Health. (1998) Jul;3(7):576-83; Na'was T, y col., J. Clin. Microbiol. (1998) 36(2):414-20. La mayor parte de las cepas de CP5 y CP8 no tipables son genéticamente de tipo 5 o tipo 8 con contenido en mutaciones en locus de

cap5/8 (Cocchiaro, Gomez y col., (2006), Mol. Microbiol. Feb. 59(3):948 a 960). La capsulación para algunas cepas se pierde con rapidez en unas pocas pasadas *in vitro* lo que se debe a un efecto represor de la alta concentración defosfato en los medios que se usan en diagnóstico clínico sobre la producción de cápsula. Se informó también de que aislados sin cápsula recuperan la expresión de cápsula tras pasar través de vacas. Véase Opdebeck, J.P. y col., J. Med. Microbiol. 19:275 a 278 (1985). Algunas cepas no tipables se hacen positivo de cápsula bajo unas condiciones de crecimiento apropiadas.

Estructura de CP5 y CP8

[0144] La unidad de repetición tanto de CP5 como de CP8 está compuesta por ácido 2-acetamido-2-desoxi-D-mannurónico, 2-acetamido-2-desoxi-L-fucosa y 2-acetamido-2-desoxi-D-fucosa. Véase C. Jones y col., Carbohidr. Res. 340:1097 a 1106 (2005). A pesar de que CP5 y CP8 tienen la misma composición de azúcar, éstos han mostrado que son inmunológicamente distintos. Éstos se diferencian en los enlaces glicosídicos y en el sitio de O-acetilación del ácido urónico. Se observó una N-acetilación incompleta dependiente de cepa de uno de los residuos de FucNAc. Véase Tzianabos y col., PNAS V98: 9365(2001).

Polisacárido de cápsula de S. aureus en una composición inmunogénica

[0145] El peso molecular de los polisacáridos de cápsula de S. aureus es una consideración importante para su uso en composiciones inmunogénicas. Los polisacáridos de cápsula de alto peso molecular son capaces de inducir ciertas respuestas inmunitarias de anticuerpo debido a una valencia más alta de los epítopos presentes en la superficie antigénica. Los procedimientos

que se describen en el presente documento prevén el aislamiento y la purificación de polisacárido de cápsula de tipo 5 y tipo 8 de mucho más alto peso molecular que los que estaban disponibles anteriormente.

Proteína de unión de saliva/MntC/SitC

[0146] Proteína de unión de saliva/MntC/SitC es una proteína de transportador ABC y tiene homólogos en S. epidermidis y S. aureus. Se hace referencia a ésta en la presente invención como MntC. Esta proteína es una lipoproteina de 32 kDa y se encuentra en la pared de célula bacteriana. Véase Sellman y col., y Cockayne y col., Infect. Immun. 66: 3767(1998). En S. epidermidis, ésta es un componente de un operón regulado por hierro. Muestra una homología considerable con ambas adhesinas incluyendo FimA de S. parasanguis, y con lipoproteinas de una familia de transportadores ABC con unas funciones de transporte de hierro metálico probadas o putativas. (Véase la tabla 12 para cepas de S. aureus y secuencias.)

Proteína MntC de S. aureus

[0147] El homólogo de S. aureus de MntC se conoce como proteina de unión de saliva y se dio a conocer en la patente de los Estados Unidos con n.° 5.801.234 y puede incluirse en una composición inmunogénica de la invención. La secuencia de proteína para el homólogo de S. aureus de proteína de unión de saliva/MntC/SitC se encuentra en el número de registro de GenBank NP_371155 para la cepa Mu50 (también se conoce como SAV0631). El identificador de secuencia es SEQ ID n.°: 119. El número de registro para la secuencia de nucleótidos para el genoma completo de la cepa Mu50 es NC_002758.2 (coordenadas 704988-705917).

Proteína SitC de S. epidermidis

[0148] El homólogo de S. epidermidis de proteína de unión de saliva/MntC/SitC se conoce como SitC y se dio a conocer en Sellman y col., (Sellman y col., Infect. Immun. octubre de 2005; 73(10): 6591 a 6600). La secuencia de proteína para el homólogo de S. epidermidis de proteína de unión de saliva/MntC/SitC se encuentra en el número de registro de GenBank YP_187886.1 (también se conoce como SERP0290). El identificador de secuencia es SEQ ID n.º: 121.

[0149] El número de registro para la secuencia de nucleótidos para el genoma completo de la cepa RP62A, es NC_002976 (coordenadas 293030-293959). Otras moléculas de SitC candidatas pueden derivarse a partir de varias especies de organismos para su uso en una composición inmunogénica de la invención, algunas de las cuales se enumeran en la tabla 1 a continuación.

Tabla 1

Proteína	Especies	Cepa de ejemplo	Registro de proteína
SitC	S. haemolyticus	JCSC1435	BAE03450.1
SitC	S. epidermidis	ATCC 12228	AAO04002.1
SitC	S. saprophyticus	ATCC 15305	BAE19233.1
SitC	S. xylosus	DSM20267	ABR57162.1
SitC	S. carnosus	TM300	CAL27186.1

Proteínas de unión a hierro de S. aureus

[0150] Otro antígeno candidato potencial para considerarse para su uso en las composiciones inmunogénicas de la invención incluye el determinante B

de superficie de hierro de proteína de superficie de S. aureus (IsdB). Esta MSCRAMM se describió por Mazmanian y col. (Mazmanian, SK y col. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 99:2293 a 2298 (2002)) y se ha sometido a prueba posteriormente y se muestra eficaz como un candidato de vacuna en un modelo de infección murino y un estudio de inmunogenicidad de macaco Rhesus de Kuklin, y col. (Kuklin, NA, y col. Infection and Immunity, Vol. 74, n.° 4, 2215 a 2223, (2006)). Esta molécula de IsdB está presente en varias cepas de S. aureus, incluyendo la cepa MRSA252 (número de registro de proteína CAG40104.1); cepa Newman (número de registro de proteína BAF67312.1); cepa MSSA476 (número de registro de proteína CAG42837.1); cepa Mu3 (número de registro de proteína BAF78003.1); cepa RF122 (número de registro de proteína CAI80681.1).

Antígenos candidatos:

[0151] Las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden incluir también uno o más de los siguientes antígenos: Opp3a, DltD, HtsA, LtaS, IsdA, IsdC, SdrF, SdrG, SdrH, SrtA, SpA, Sbi alfa-hemolisina (hla), beta-hemolisina, proteína A de unión a fibronectina (fnbA), proteína B de unión a fibronectina (fnbB), coagulasa, Fig, map, leucocidina Panton-Valentine (pvl), alfa-toxina y sus variantes, gamma-toxina (hlg) y variantes, ica, transportador ABC inmunodominante, transportador Mg2+, transportador ABC de Ni, RAP, autolisina, receptores de laminina, IsaA/PisA, IsaB/PisB, SPOIIIE, SsaA, EbpS, Sas A, SasF, SasH, EFB (FIB), SBI, Npase, EBP, sialoproteína II de unión a hueso, precursor de aureolisina (AUR)/Sepp1, Cna, y fragmentos de los mismas tal como M55, TSST-1, mecA, poli-N-acetilglucosamina (PNAG/dPNAG) exopolisacárido, GehD, EbhA, EbhB,

SSP-1, SSP-2, HBP, proteína de unión a vitronectina, HarA, EsxA, EsxB, Enterotoxina A, Enterotoxina B, Enterotoxina C1, y autolisina novedosa. En ciertas realizaciones de la invención, cuando la composición inmunogénica comprende ciertas formas de CP5 y/o CP8, puede no comprender además PNAG.

Formulaciones de composición inmunogénica

[0152] En una realización, las composiciones inmunogénicas de la invención comprenden además al menos uno de un adyuvante, un tampón, un crioprotector, una sal, un catión divalente, un detergente no iónico, un inhibidor de oxidación por radicales libres, un diluyente o un portador.

[0044] Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden comprender además uno o más conservantes además de una pluralidad de antígenos proteicos estafilocócicos y conjugados de polisacárido capsular-proteína. La FDA requiere que los productos biológicos en viales de múltiples dosis (múltiples dosis) contengan un conservante, con sólo unas pocas excepciones. Los productos de vacuna con contenido en conservantes incluyen vacunas con contenido en cloruro de benzetonio (ántrax), 2-fenoxietanol (DTaP, HepA, Lyme, Polio (parenteral)), fenol (Pneumo, Typhoid (parenteral), Vaccinia) y timerosal (DTaP, DT, Td, HepB, Hib, Influenza, JE, Mening, Pneumo, Rabies). Conservantes aprobados para su uso en fármacos inyectables incluyen, por ejemplo, clorobutanol, m-cresol, metilparaben, propilparaben, 2-fenoxietanol, cloruro de benzetonio, cloruro de benzalconio, ácido benzoico, alcohol bencílico, fenol, timerosal y nitrato fenilmercúrico.

[0153] Las formulaciones de la invención pueden comprender además uno o más de un tampón, una sal, un catión divalente, un detergente no iónico, un crioprotector tal como un azúcar, y un antioxidante tal como un eliminador de radicales libres o agente quelante, o cualquier combinación múltiple de los mismos. La elección de un componente cualquiera, por ejemplo, un agente de quelación, puede determinar si es deseable otro componente (por ejemplo, un eliminador) o no. La composición final que se formula para la administración ha de ser estéril y/o libre de pirógenos. El experto puede determinar de forma empírica qué combinaciones de estos y otros componentes serán óptimas para la inclusión en las composiciones inmunogénicas con contenido en conservante de la invención, dependiendo de una variedad de factores tales como las condiciones de almacenamiento y de administración particulares que se requieren.

[0154] En ciertas realizaciones, una formulación de la invención que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más tampones fisiológicamente aceptables que se seleccionan de, pero sin limitarse a, Tris (trimetamina), fosfato, acetato, borato, citrato, glicina, histidina y succinato. En ciertas realizaciones, la formulación está tamponada a dentro de un intervalo de pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 9,0, preferentemente de aproximadamente 6,4 a aproximadamente 7,4.

[0155] En ciertas realizaciones, puede ser deseable ajustar el pH de la composición inmunogénica o formulación de la invención. El pH de una formulación de la invención puede ajustarse usando técnicas convencionales en la técnica. El pH de la formulación puede ajustarse para ser de entre 3,0 y 8,0. En ciertas realizaciones, el pH de la formulación puede ser, o puede

ajustarse para ser, entre 3,0 y 6,0, 4,0 y 6,0, o 5,0 y 8,0. En otras realizaciones, el pH de la formulación puede ser, o puede ajustarse para ser, aproximadamente 3,0, aproximadamente 3,5, aproximadamente 4,0, aproximadamente 4,5, aproximadamente 5,0, aproximadamente 5,5, aproximadamente 5,8, aproximadamente 6,0, aproximadamente 6,5, aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,5, o aproximadamente 8,0. En ciertas realizaciones, el pH puede ser, o puede ajustarse para ser, en un intervalo de 4,5 a 7,5, o de 4,5 a 6,5, de 5,0 a 5,4, de 5,4 a 5,5, de 5,5 a 5,6, de 5,6 a 5,7, de 5,7 a 5,8, de 5,8 a 5,9, de 5,9 a 6,0, de 6,0 a 6,1, de 6,1 a 6,2, de 6,2 a 6,3, de 6,3 a 6,5, de 6,5 a 7,0, de 7,0 a 7,5 o de 7,5 a 8,0. En una realización específica, el pH de la formulación es de aproximadamente 5,8.

[0156] En ciertas realizaciones, una formulación de la invención que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más cationes divalentes, incluyendo pero sin limitarse a, $MgCl_2$, $CaCl_2$ y $MnCl_2$, a una concentración variando de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 10 mM, prefiriéndose con hasta aproximadamente 5 mM.

[0157] En ciertas realizaciones, una formulación de la invención que es compatible con la administración parenteral comprende una o más sales, incluyendo pero sin limitarse a, cloruro de sodio, cloruro de potasio, sulfato de sodio, y sulfato de potasio, presentes a una fuerza iónica que es fisiológicamente aceptable por el sujeto tras la administración parenteral e incluidas a una concentración final para producir una fuerza iónica u osmolaridad seleccionadas en la formulación final. La fuerza iónica u osmolalidad finales de la formulación se determinará por múltiples

componentes (por ejemplo, iones de compuesto(s) de tamponamiento y otras sales de no tamponamiento. Una sal preferida, NaCl, está presente desde un intervalo de hasta aproximadamente 250 mM, seleccionándose las concentraciones de sal para complementar otros componentes (por ejemplo, azúcares) de tal modo que la osmolaridad total final de la formulación es compatible con la administración parenteral (por ejemplo, inyección intramuscular o subcutánea) y promoverá la estabilidad a largo plazo de los componentes inmunogénicos de la formulación de composición inmunogénica a lo largo de varios intervalos de temperatura. Formulaciones libres de sal tolerarán intervalos aumentados del uno o más crioprotectores seleccionados para mantener los niveles de osmolaridad finales deseados.

[0158] En ciertas realizaciones, una formulación de la invención que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más crioprotectores que se seleccionan de, pero sin limitarse a, disacáridos (por ejemplo, lactosa, maltosa, sacarosa o trehalosa) y polihidroxi-hidrocarburos (por ejemplo, dulcitol, glicerol, manitol y sorbitol).

[0159] En ciertas realizaciones, la osmolaridad de la formulación está en un intervalo de aproximadamente 200 mOs/L a aproximadamente 800 mOs/L, con un intervalo preferido de aproximadamente 250 mOs/L a aproximadamente 500 mOs/L, o aproximadamente 300 mOs/L a aproximadamente 400 mOs/L. Una formulación libre de sal puede contener, por ejemplo, de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 25 % de sacarosa, y preferentemente de aproximadamente un 7 % a aproximadamente un 15 %, o aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 12 % de sacarosa. Alternativamente, una formulación

135

libre de sal puede contener, por ejemplo, de aproximadamente un 3 % a aproximadamente un 12 % de sorbitol, y preferentemente de aproximadamente un 4 % a un 7 %, o aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 6 % de sorbitol. Si se añade una sal tal como cloruro de sodio, a continuación el intervalo eficaz de sacarosa o sorbitol se reduce relativamente. Estas y otras consideraciones tales como la osmolalidad y la osmolaridad se conocen bien en la técnica.

[0160] En ciertas realizaciones, una formulación de la invención que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más inhibidores de la oxidación por radicales libres y/o agentes quelantes. Una variedad de eliminadores de radicales libres y agentes de quelación se conocen en la técnica y se aplican a las formulaciones y los procedimientos de uso que se describen en el presente documento. Los ejemplos incluyen pero no se limitan a etanol, EDTA, una combinación de EDTA/etanol, trietanolamina, manitol, histidina, glicerol, citrato de sodio, hexafosfato de inositol, tripolifosfato, ácido ascórbico/ascorbato, ácido succínico/succinato, ácido málico/maleato, desferal, EDDHA y DTPA, y varias combinaciones de dos o más de los anteriores. En ciertas realizaciones, al menos puede añadirse un eliminador de radicales libres no reductor a una concentración que aumenta eficazmente la estabilidad a largo plazo de la formulación. También puede añadirse uno o más inhibidores de la oxidación por radicales libres/agentes de quelación en varias combinaciones, tal como un eliminador y un catión divalente. La elección de agente de quelación determinará si es necesaria o no la adición de un eliminador.

[0161] En ciertas realizaciones, una formulación de la invención que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más tensioactivos iónicos, incluyendo pero sin limitarse a, ésteres de ácido graso de polioxietileno sorbitano, Polysorbate-80 (Tween 80), Polysorbate-60 (Tween 60), Polysorbate-40 (Tween 40) y Polysorbate-20 (Tween 20), polioxietileno-alquil éteres, incluyendo pero sin limitarse a, Brij 58, Brij 35, así como otros tales como Triton X-100; Triton X-114, NP40, Span 85 y la serie de tensioactivos no iónicos de Pluronic (por ejemplo, Pluronic 121), con componentes preferidos Polysorbate-80 a una concentración de aproximadamente un 0,001 % a aproximadamente un 2 % (prefiriéndose hasta aproximadamente un 0,25 %) o Polysorbate-40 a una concentración de aproximadamente de un 0,001 % a un 1 % (prefiriéndose hasta aproximadamente un 0,5 %).

[0162] En ciertas realizaciones, una formulación de la invención comprende uno o más agentes de estabilización adicionales adecuados para su administración parenteral, por ejemplo, un agente reductor que comprende al menos un grupo tiol (-SH) (por ejemplo, cisteína, N-acetilcisteína, glutatión reducido, tioglicolato de sodio, tiosulfato, monotioglicerol, o mezclas de los mismos). Alternativa u opcionalmente, las formulaciones de composición inmunogénica que contienen conservante de la invención pueden estabilizarse adicionalmente eliminando el oxígeno de los recipientes de almacenamiento, protegiendo a la formulación de la luz (por ejemplo, usando recipientes de vidrio de color ámbar).

[0163] Las formulaciones de composición inmunogénica que contienen conservante de la invención pueden comprender uno o más portadores o

excipientes farmacéuticamente aceptables, lo que incluye cualquier excipiente que no induce por sí mismo una respuesta inmunitaria. Los excipientes adecuados incluyen pero no se limitan a macromoléculas tal como proteínas, sacáridos, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, sacarosa (Paoletti y col, 2001, Vaccine, 19:2118), trehalosa, lactosa y agregados de lípidos (tales como gotas de aceite o liposomas). Tales portadores son bien conocidos por el experto. Excipientes farmacéuticamente aceptables se analizan, por ejemplo, en Gennaro, 2000, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición, ISBN:0683306472.

[0164] Las composiciones de la invención pueden estar liofilizadas o en forma acuosa, es decir disoluciones o suspensiones. Las formulaciones líquidas pueden administrarse de forma ventajosa directamente a partir de su forma envasada y son por lo tanto ideales para inyección sin la necesidad de reconstitución en medio acuoso tal como se requiere de otro modo para composiciones liofilizadas de la invención.

[0165] La administración directa de composiciones inmunogénicas de la presente invención a un sujeto puede llevarse a cabo mediante la administración parenteral (por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía intradérmica, por vía subcutánea, por vía intravenosa, o en el espacio intersticial de un tejido); o mediante administración rectal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intranasal, ocular, auditiva, pulmonar u otra administración mucosa. En una realización preferida, la administración parenteral es mediante inyección intramuscular, por ejemplo, en el muslo o el brazo del sujeto. La inyección puede ser a través de una aguja (por

ejemplo, una aguja hipodérmica), pero alternativamente puede usarse una inyección libre de aguja. Una dosis intramuscular típica es de 0,5 ml. Las composiciones de la invención pueden prepararse en varias formas, por ejemplo, para inyección o bien como disoluciones líquidas o bien como suspensiones. En ciertas realizaciones, la composición puede prepararse como un polvo o pulverización para su administración pulmonar, por ejemplo, en un inhalador. En otras realizaciones, la composición puede prepararse como un supositorio u óvulo vaginal, o para su administración nasal, auditiva u ocular, por ejemplo, como una pulverización, gotas, gel o polvo.

[0166] Pueden determinarse unas cantidades óptimas de componentes para una composición inmunogénica particular mediante unos estudios convencionales que implican la observación de unas respuestas inmunitarias apropiadas en los sujetos. Siguiendo una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo separadas de forma adecuada.

Acondicionamiento y Formas farmacéuticas

[0167] Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden envasarse forma de dosis unitaria o múltiples dosis (por ejemplo, 2 dosis, 4 dosis, o más). Para formas de múltiples dosis, habitualmente pero no necesariamente se prefieren los viales con respecto a las jeringuillas previamente cargadas. Los formatos de múltiples dosis adecuados incluyen pero no se limitan a: de 2 a 10 dosis por recipiente a 0,1 a 2 ml por dosis. En ciertas realizaciones, la dosis es una dosis de 0,5 ml. Véase, por ejemplo, la

137

solicitud de patente internacional WO2007/127668, que se incorpora por referencia en el presente documento.

Las composiciones pueden presentarse en viales u otros recipientes de almacenamiento adecuados, o pueden presentarse en dispositivos de administración cargados previamente, por ejemplo, jeringuillas de un solo componente o múltiples componentes, que pueden suministrarse con o sin agujas. Una jeringuilla habitualmente, pero no necesariamente, contiene una dosis individual de la composición inmunogénica con contenido en conservante de la invención, a pesar de que también se prevén jeringuillas de múltiples dosis, cargadas previamente. De forma similar, un vial puede incluir una dosis individual pero alternativamente puede incluir múltiples dosis.

[0168] Los volúmenes de dosificación eficaces pueden establecerse de forma rutinaria, pero una dosis típica de la composición para inyección tiene un volumen de 0,5 ml. En ciertas realizaciones, la dosis se formula para la administración a un sujeto humano. En ciertas realizaciones, la dosis se formula para la administración a un sujeto humano adulto, joven, adolescente, niño o lactante (es decir, no más de un año de edad) y en realizaciones preferidas puede administrarse mediante inyección.

[0169] Las composiciones inmunogénicas líquidas de la invención son también adecuadas para reconstituir otras composiciones inmunogénicas que se presentan en forma liofilizada. Cuando una composición inmunogénica va a usarse para tal reconstitución extemporánea, la invención proporciona un kit con dos o más viales, dos o más jeringuillas cargadas

preparadas, o uno o más de cada, usándose el contenido de la jeringuilla para reconstituir el contenido del vial antes de la inyección, o viceversa.

[0170] Alternativamente, las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden liofilizarse y reconstituirse, por ejemplo, usando uno de una multitud de procedimientos para la liofilización que se conocen bien en la técnica para formar partículas secas, de forma regular (por ejemplo, esférica), tal como microgránulos o esferas, que tienen características de partícula tal como tamaños de diámetro medio que pueden seleccionarse y controlarse variando los procedimientos exactos que se usan para prepararlos. Las composiciones inmunogénicas pueden comprender además un adyuvante que puede prepararse opcionalmente con o estar contenido en partículas secas, de forma regular (por ejemplo, esféricas) separadas tal como microgránulos o esferas. En tales realizaciones, la presente invención proporciona además un kit de composición inmunogénica que comprende un primer componente que incluye una composición inmunogénica seca, estabilizada, que comprende además opcionalmente uno o más conservantes de la invención, y un segundo componente que comprende una disolución acuosa, estéril, para la reconstitución del primer componente. En ciertas realizaciones, la disolución acuosa comprende uno o más conservantes, y puede comprender opcionalmente al menos un adyuvante (véase, por ejemplo, el documento WO2009/109550 (que se incorpora en el presente documento por referencia).

[0171] Aún en otra realización, un recipiente del formato de múltiples dosis se selecciona de uno o más del grupo que consiste en, pero sin limitarse a, artículos de vidrio de laboratorio generales, matraces, vasos de precipitados,

cilindros graduados, fermentadores, biorreactores, tubos, tuberías, bolsas, jarras, viales, cierres para viales (por ejemplo, un tapón de caucho, un tornillo en la tapa), ampollas, jeringuillas, jeringuillas de doble cámara o de múltiples cámaras, tapones de jeringuilla, émbolos de jeringuillas, cierres de caucho, cierres de plástico, cierres de vidrio, cartuchos y plumas desechables y similares. El recipiente de la presente invención no está limitado en cuanto al material de fabricación, e incluye materiales tal como vidrio, metales (por ejemplo, acero, acero inoxidable, aluminio, etc.) y polímeros (por ejemplo, termoplásticos, elastómeros, elastómeros termoplásticos). En una realización particular, el recipiente del formato es un vial de vidrio Schott tipo 1 de 5 ml con un tapón de butilo. El experto apreciará que el formato expuesto anteriormente no es de ningún modo una lista exhaustiva, sino que simplemente sirve como guía para el experto con respecto a la variedad de formatos disponibles para la presente invención. Formatos adicionales contemplados para su uso en la presente invención pueden encontrarse en catálogos publicados de vendedores y fabricantes de equipos de laboratorio tal como United States Plastic Corp. (Lima, OH), VWR.

Evaluación de Composiciones inmunogénicas

[0172] En una realización, la presente invención proporciona composiciones inmunogénicas que comprenden al menos tres antígenos a partir de un organismo de S. aureus.

[0173] Varias pruebas *in vitro* se usan para evaluar la inmunogenicidad de las composiciones inmunogénicas de la invención. Por ejemplo, un ensayo opsónico *in vitro* se realiza incubando juntos una mezcla de células

estafilocócicas, suero inactivado por calor con contenido en específico anticuerpos para los antígenos en cuestión, y una fuente de complemento exógena. La opsonofagocitosis continúa durante la incubación de células polimorfonucleares (PMN) recién aisladas o células efectoras diferenciadas tal como HL60 y la mezcla anticuerpo/complemento/célula estafilocócica. Las células bacterianas que se recubren con anticuerpo y complemento se destruyen tras la opsonofagocitosis. Las unidades de formación de colonias (ufc) de las bacterias que sobrevivieron que se recuperan de la opsonofagocitosis se determinan colocando en placa la mezcla de ensayo. Se informa de los títulos como el recíproco de la más alta dilución que proporciona un 50 % de destrucción bacteriana, tal como se determina por comparación con controles de ensayo.

[0174] Un ensayo ELISA celular completo se usa también para evaluar la inmunogenicidad *in vitro* y la exposición de superficie del antígeno, en el que la cepa bacteriana de interés (S. aureus) se recubre sobre una placa, tal como una placa de 96 pocillos, y se hace que sueros de prueba a partir de un animal inmunizado reaccionen con las células bacterianas. Si cualquier anticuerpo, específico para el antígeno de prueba, es reactivo con un epítopo de superficie expuesta del antígeno, puede detectarse mediante procedimientos convencionales conocidos por un experto en la técnica.

[0175] Cualquier antígeno que muestre la actividad *in vitro* deseada se prueba a continuación en un modelo de exposición animal *in vivo*. En ciertas realizaciones, se usan composiciones inmunogénicas en la inmunización de un animal (por ejemplo, un ratón) mediante procedimientos y vías de inmunización conocidos por los expertos en la técnica (por ejemplo,

intranasal, parenteral, oral, rectal, vaginal, transdérmica, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, etc.). Siguiendo la inmunización del animal con una composición inmunogénica de Staphylococcus sp. particular, el animal se expone a una Staphylococcus sp. y se somete a ensayo para resistencia frente a la infección por estafilococos.

[0176] En una realización, se inmunizan ratones libres de patógeno y se exponen a S. aureus. Por ejemplo, se inmunizan ratones con una o más dosis del antígeno deseado en una composición inmunogénica. Posteriormente, los ratones se exponen a S. aureus y se supervisa la supervivencia a lo largo del tiempo después de la exposición.

Procedimientos de Inmunización

[0177] Se proporcionan también procedimientos para immunizar un huésped para evitar infecciones por estafilococos. En una realización preferida, el huésped es un ser humano. Por lo tanto, un huésped o sujeto se administra una cantidad inmunogénica de una composición inmunogénica tal como se describe en el presente documento. Una cantidad inmunogénica de una composición inmunogénica puede determinarse realizando un estudio de respuesta a dosis en el que los sujetos se inmunizan con unas cantidades gradualmente en aumento de la composición inmunogénica y la respuesta inmunitaria se analiza para determinar la dosificación óptima. Los puntos de inicio para el estudio pueden inferirse a partir de datos de inmunización en modelos animales. La cantidad de dosificación puede variar dependiendo de las condiciones específicas del individuo. La cantidad puede determinarse en pruebas de rutina por medios conocidos por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, el procedimiento de inmunización de un huésped para

evitar enfermedad, afección o infección por estafilococos comprende un tratamiento en seres humanos, veterinaria, en animales o en la agricultura. Otra realización proporciona un procedimiento de inmunización de un huésped para evitar enfermedad, afección o infección por estafilococos asociada con una Staphylococcus sp. en un sujeto, comprendiendo el procedimiento la generación de una preparación de anticuerpos policlonales o monoclonales a partir de la composición inmunogénica que se describe en el presente documento, y usando dicha preparación de anticuerpos para conferir inmunidad pasiva al sujeto.

[0178] Una cantidad inmunológicamente eficaz de la composición inmunogénica en un número apropiado de dosis se administra al sujeto para provocar una respuesta inmunitaria. El individuo tratado no debería de exhibir las manifestaciones clínicas más graves de la infección por estafilococos. La cantidad de dosificación puede variar dependiendo de condiciones especificas del individuo, tal como edad y peso. Esta cantidad puede determinarse en pruebas de rutina por medios conocidos por los expertos en la técnica.

[0179] En una realización, pacientes al os que se administran composiciones inmunogénicas de la invención muestran una reducción en las tasas de estado de portador de S. aureus. Tal reducción en estado de portador o un intervalo de tiempo prolongado invertido como un no portador a continuación de la administración de una composición inmunogénica es significativa desde una perspectiva de necesidad médica. Por ejemplo, una reducción en el estado de portador de S. aureus global en portadores puede evaluarse a continuación de una dosis de vacuna multiantígeno de S. aureus. Por

ejemplo, 1 día antes de la administración de una composición inmunogénica, un grupo de adultos con edades de 18 a 50 años puede examinarse en busca de estado de portador mediante aplicación de hisopo nasal y de garganta seguidos por cultivo para determinar su estado de portador. A continuación, puede administrarse al grupo una composición inmunogénica de la invención, recibiendo un grupo un control. Aplicación de hisopo nasal y de garganta se realizó semanalmente a lo largo de un periodo de 12 semanas, y se realiza mensualmente hasta 6 meses después de la administración de la composición inmunogénica y en comparación con placebo. Un punto final primario es comparar las tasas de estado de portador en pacientes después de la administración de una composición inmunogénica frente a placebo en intervalos de 3 meses después de la inmunización.

Modelos animales de Infección por estafilococos

[0180] Varios modelos animales se describen a continuación para su uso para evaluar la eficacia de una cualquiera de las composiciones inmunogénicas que se describen en el presente documento.

Modelo murino de septicemia (Pasiva o Activa)

Modelo de inmunización pasiva

[0181] Se inmunizan unos ratones de forma pasiva por vía intraperitoneal (i.p.) con IgG inmunitario o anticuerpo monoclonal. Los ratones se exponen posteriormente 24 horas más tarde a una dosis letal de S. aureus. La exposición bacteriana se administra por vía intravenosa (i.v.) o i.p. lo que asegura que cualquier supervivencia puede atribuirse a la interacción *in vivo* específica del anticuerpo con las bacterias. Se determina que la dosis de

exposición bacteriana es la dosis que se requiere para conseguir una septicemia letal de aproximadamente un 20 % de los ratones de control no inmunizados. La evaluación estadística de los estudios de supervivencia puede llevarse a cabo mediante un análisis de Kaplan-Meier.

Modelo de inmunización activa

[0182] En este modelo, ratones (por ejemplo, ratones de Swiss Webster) se inmunizan de forma activa por vía intraperitoneal (i.p.) o por vía subcutánea (SC) con un antígeno diana a 0, 3 y 6 semanas (u otro programa de vacunación similar separado apropiadamente) y posteriormente se exponen a S. aureus en la semana 8 por vía intravenosa. La dosis de exposición bacteriana se calibra para obtener aproximadamente un 20 % de supervivencia en el grupo de control a lo largo de un periodo de 10 a 14 días. La evaluación estadística de los estudios de supervivencia puede llevarse a cabo mediante un análisis de Kaplan-Meier.

Modelo de endocarditis infecciosa (Pasiva o Activa)

[0183] Un modelo de inmunización pasiva para endocarditis infecciosa (IE) causada por S. aureus se ha usado anteriormente para mostrar que el ClfA puede inducir una inmunidad protectora. Véase Vernachio y col., Antmicro. Agents & Chemo. 50:511 a 518 (2006). En este modelo de IE, se usan conejos o ratas para simular unas infecciones clínicas que incluyen un catéter venoso central, bacteriemia, y siembra hematógena a órganos distales. A unos conejos o ratas cateterizados con vegetaciones de válvula aórtica estériles se les administra una única o múltiples inyecciones intravenosas de un anticuerpo monoclonal o policlonal específico para el antígeno diana. Posteriormente, los animales se exponen por vía i.v. con a

S. aureus o S. epidermidis cepa. A continuación, después de una exposición, corazón, vegetaciones cardíacas, y tejidos adicionales, incluyendo riñones, y sangre se recolectan y se cultivan. La frecuencia de infección por estafilococos en cardíaca tejido, riñones, y sangre se mide a continuación. En un estudio, cuando los animales se expusieron a o bien MRSE ATCC 35984 o bien MRSA 67-0, se mostraron unas reducciones significativas en la velocidad de infección usando o bien la preparación de anticuerpos policlonales o bien la de anticuerpos monoclonales frente a ClfA. Véase Vernachio y col., Antmicro. Agents & Chemo. 50:511 a 518 (2006).

[0184] El modelo de endocarditis infecciosa se ha adaptado también para los estudios de inmunización activa tanto en conejos como en ratas. Se inmunizan conejos o ratas por vía intramuscular o por vía subcutánea con un antígeno diana y se exponen a S. aureus dos semanas más tarde por vía intravenosa.

Modelo de pielonefritis

[0185] En el modelo de pielonefritis, se inmunizan ratones en las semanas 0, 3 y 6 (u otro programa de inmunización separado apropiadamente) con los antígenos diana. Posteriormente, los animales se exponen por vía i.p. o i.v. a PFESA0266 de S. aureus. Después de 48 horas, los riñones se recolectan y se recuentan las UFC bacterianas.

Anticuerpos y Composiciones de anticuerpos

[0186] La invención proporciona además anticuerpos y composiciones de anticuerpos que se unen específica y selectivamente a uno o más antigenos de una composición inmunogénica de la presente invención. En algunas realizaciones, los anticuerpos se generan después de la administración a un

sujeto de una composición inmunogénica de la presente invención. En algunas realizaciones, la invención proporciona unos anticuerpos purificados o aislados que se dirigen contra uno o más de los antígenos de una composición inmunogénica de la presente invención. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención son funcionales tal como se mide por la destrucción de bacterias o bien en un modelo de eficacia animal o bien a través de un ensayo de destrucción opsonofagocítica. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención confieren inmunidad pasiva a un sujeto. La presente invención proporciona además unas moléculas de polinucleótido que codifican un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención, y una célula o línea celular (tal como células de hibridoma u otras líneas celulares diseñadas por ingeniería genética para la producción recombinante de anticuerpos) y un animal transgénico que produce un anticuerpo o una composición de anticuerpo de la invención, usando unas técnicas bien conocidos por los expertos en la técnica.

[0187] Los anticuerpos o composiciones de anticuerpos de la invención pueden usarse en un procedimiento de tratamiento o prevención de una enfermedad, afección o infección por estafilococos asociada con una Staphylococcus sp. en un sujeto, comprendiendo el procedimiento la generación de una preparación de anticuerpos policlonales o monoclonales, y el uso de dicho anticuerpo o composición de anticuerpo para conferir inmunidad pasiva al sujeto. Los anticuerpos de la invención pueden ser útiles también para procedimientos de diagnóstico, por ejemplo, detectar la

presencia o cuantificar los niveles de uno o más antígenos de las composiciones inmunogénicas de la presente invención.

EJEMPLOS

[0188] Los siguientes ejemplos muestran algunas realizaciones de la presente invención. No obstante, ha de entenderse que estos ejemplos son para ilustración sólo y no pretenden definir completamente las condiciones y el alcance de la presente invención. Debe apreciarse que cuando se han dado condiciones de reacción típicas (por ejemplo, temperatura, tiempo de reacción, etc.), también pueden usarse condiciones por encima y por debajo de los intervalos especificados, a pesar de que en general de manera menos conveniente. Tdoas las partes y porcentajes a las que se hace referencia en el presente documento son en peso y todas las temperaturas están expresadas en grados centígrados a menos que se especifique lo contrario.

[0189] Además, los siguientes ejemplos se llevaron a cabo usando técnicas convencionales, que se conocen bien y son rutinarias para los expertos en la técnica, excepto cuando se describa lo contrario en detalle. Tal como se indicó anteriormente, los siguientes ejemplos están representados para fin ilustrativo, y no deben interpretarse de ningún modo como limitantes del alzance de la presente invención.

Ejemplo 1: Producción de Antígenos ClfA y ClfB

[0190] El factor de aglutinación A (ClfA) y B (ClfB) son proteínas de superficie de S. aureus responsables de la unión a proteínas huésped incluyendo fibrinógeno (ClfA, ClfB) y citoqueratina 10 (ClfB). ClfA y ClfB son miembros de una familia de proteínas con contenido en el motivo LPXTG carboxilo terminal (SEQ ID n.º: 125) que permite que la proteína se una

covalentemente con la superficie celular. Tanto ClfA como ClfB pertenecen a la familia de proteínas (componentes superficiales microbianos que reconocen las moléculas adhesivas de la matriz, o MSCRAMM) que reconocen y se unen a proteínas de matriz extracelular huésped tal como fibrinógeno (ClfA y ClfB), fibronectina (FnbA y FnbB), colágeno (Cna), y otras. Todas estas proteínas comparten la secuencia señal de amino terminal que media el transporte a la superficie celular. Las MSCRAMM también incluyen un dominio A que es la región funcional que contiene un sitio de unión a ligando para fibrinógeno, fibronectina, elastina, y queratina. El dominio A puede ir seguido de una región que está compuesta por repeticiones de serina-aspartato (repetición de SD), que se piensa que abarca la capa de peptidoglicano. La repetición de SD va seguida por una región de extensión de membrana que incluye el motivo LPXTG (SEQ ID n.º: 125) para enlace covalente de la proteína a peptidoglicano.

[0191] Las regiones de unión a ligando de ClfA y ClfB que comprende N1N2N3 del dominio A abarcan los aminoácidos 40 a 559. Los dominios N de ClfA / ClfB se han asignado tal como sigue: N1 engloba los residuos 45 a 220; N2 engloba los residuos 229 a 369; y N3 engloba los residuos 370 a 559. Véase Deivanayagam y col. EMBO J. 21:6660 a 6672 (2002). En preparaciones de ClfA N1N2N3 recombinante, se ha encontrado que el dominio de N1 es sensible a proteasa y se escinde o hidroliza fácilmente para dejar el N23 como un fragmento recombinante de unión a ligando estable. Véase Deivanayagam y col. EMBO J. 21:6660 a 6672 (2002). De forma similar, se mostró que el dominio N1 de ClfB es también sensible a proteasa y podría escindirse fácilmente mediante metaloproteasa de S.

aureus (McAleese, F. M. y col. J. Biol. Chem. 2001, 276, págs. 29969 a 29978). La estructura de cristal del fragmento N23 de unión a fibrinógeno N23 del dominio A de ClfA, reveló que tanto N2 como N3 están dominados por cadenas beta antiparalelas. Además de las cadenas beta antiparalelas, el dominio de N2 contiene una hélice alfa de vuelta única y dos hélices 310 y el dominio de N3 contiene tres hélices 310. Véase Deivanayagam y col. EMBO J. 21:6660 a 6672 (2002).

[0192] El alineamiento de secuencia de N2 y N3 revela sólo un 13 % de identidad de secuencia y un 36 % de similitud de secuencia a lo largo de sus longitudes. Véase Deivanayagam y col. EMBO J. 21:6660 a 6672 (2002). La topología de los dominios de N2 y de N3 es similar al clásico pliegue de IgG y se ha propuesto que sean variantes novedosas del pliegue de IgG. Véase Deivanayagam y col. EMBO J. 21:6660 a 6672 (2002).

Formas recombinantes de ClfA que se usan en las composiciones inmunogénicas que se describen en el presente documento son fragmentos de ClfA que comprenden uno o más de los dominios N, por ejemplo, N1N2N3, N2N3 y se denominan en el presente documento como "ClfA recombinante" o "rClfA". Además, cualquier rClfA debe ser aquél que mantenga la estructura nativa de los dominios N individuales y epítopos críticos pero que no interfiera con procesos normales del individuo inmunizado después de la administración (es decir, que no se una al fibrinógeno). Estudios mutacionales han mostrado que la mutación de Y338A (N2) eliminaba completamente la unión del fragmento N23 fragmento a fibrinógeno. (Esta posición Y338A se refiere a un cambio de una tirosina a una alanina en la posición 338 en la forma inmadura de la secuencia de

polipéptido con la secuencia líder aún unida. Este cambio puede verse en la posición 310 en la forma adulta del polipéptido de ClfA mutado de SEQ ID n.º: 123 que muestra una falta de unión a fibrinógeno). Véase Deivanayagam y col. EMBO J. 21:6660 a 6672 (2002). Por lo tanto, la mutación Y338A se ha adoptado para todos los fragmentos de ClfA en los siguientes estudios.

[0193] De forma similar, formas recombinantes de ClfB que se usan en las composiciones inmunogénicas que se describen en el presente documento son fragmentos de ClfB que comprende uno o más de los dominios N, por ejemplo, N1N2N3, N2N3 y a los que se hace referencia en el presente documento como "ClfB recombinante" o "rClfB". Además, cualquier rClfB debería de ser uno que mantenga la estructura nativa de los dominios N individuales y epítopos críticos pero que no interfiera con los procesos normales de los individuo inmunizados después de la administración (es decir, que no se una a fibrinógeno). (Véase, por ejemplo, Walsh, E.J. y col. Microbiology (2008), 154, 550 a 558).

ClfA y ClfB: Visión de conjunto de la estrategia de clonación

[0194] Las diferentes formas de proteína de rClfA que se usan para generar datos de eficacia preclínica incluyen HisClfA(N123); T7ClfA(N123); T7ClfA(N123); Y338A; ClfA(N23) y ClfA(N23)Y338A. Véase la figura 1. El gen ClfA contiene la región A que codifica la secuencia a partir de S. aureus PFESA0237 que se corresponde con residuos 40 a 559. El marco de lectura clonado a partir de S. aureus se fusionó con la etiqueta de His de N-terminal y secuencias de ligador del vector (MRGSHHHHHHGS SEQ ID n.º: 127) junto con tres secuencias de codificación adicionales (KLN) que se introducen en el C-terminal. (Véase a continuación para el procedimiento

detallado). La proteína que se expresa a partir de este vector se usó para todos los experimentos a los que se hace referencia como HisClfA(N123).

[0195] Las diferentes formas de rClfA se derivaron de la región A (residuos 40 a 559 de ClfA expresados mediante S. aureus PFESA0237 (fila superior). La HisClfA(N123) se expresa usando el promotor T5 contenido en pQE30 y todas las otras formas se expresan usando el sistema de expresión basado en pET de T7.

[0196] Dos formas de ClfB (T7ClfB N1N2N3 y ClfB N23) se utilizaron para estudios de animales preclínicos.

Procedimiento de clonación de ClfA

[0197] La secuencia de codificación de ClfA que se corresponde con residuos de aminoácido 40 a 559 a partir de la cepa de S. aureus PFESA0237 se clonó y la mutación, Y338A, se introdujo para eliminar la unión a fibrinógeno. El gen ClfA mutado se introdujo en un vector de expresión de ARN polimerasa de T7, pET9a (Novagen) para proporcionar un plásmido, pLP1179. La secuencia de ADN de la región que comprende el promotor T7 y la región de codificación en pLP1179 es SEQ ID:124. El vector de expresión se transformó en BLR(DE3) de E. coli (Novagen) para la producción de ClfA recombinante.

[0198] La construcción de T7ClfA(N123)Y338A implicaba varias etapas. Un resumen de las etapas de clonación que se usan para la construcción del plásmido de expresión final, pLP1179 se muestra en la figura 2.

[0199] La secuencia de ADN de ClfA presente en pQEClf40 se corresponde con residuos de aminoácido 40 a 559 de ClfA que se clonaron originalmente en el sitio de clonación de BamHI/HindIII de pQE30. Esto crea una fusión de

etiqueta de His en el extremo N-terminal de ClfA y la adición de tres residuos en el C-terminal. La región de codificación de ClfA presente en (AmpR) pQEClf40 se subclonó en el vector KanR pET 27b (Novagen) para crear pLP1137. Además la secuencia de ADN de ClfA que se corresponde con residuos de aminoácido 221 a 559 se clonó en el sitio de clonación NdeI-HindIII de pET27b para crear pLP1134. La etiqueta de His de N-terminal de ClfA se sustituyó con el T7 N-terminal subclonando el fragmento de ADN BamHI-BlpI a partir de pQEClf40 en pET9a (Novagen) para crear pLP1153. La secuencia de codificación de T7ClfA(N123) presente en pLP1153 contiene 11 Residuos de aminoácido N-terminal a partir de la etiqueta T7 de pET9a seguido por tres residuos de aminoácido a partir de secuencias de ligador más los tres residuos derivados de ligador C-terminal originalmente presentes en pQE30Clf40. La mutación Y338A se introdujo en lugar primer lugar en la secuencia de codificación de ClfA(N23) de pLP1134 para crear pLP1168. Más tarde un fragmento de ADN de PstI-SnaBI con contenido en la mutación Y338A a partir de ClfA(N23) de pLP1168 se sustituyó en PstI-SnaBI de secuencia de codificación de T7ClfA(N123) de pLP1153 para crear pLP1171. Un sitio de unión a ribosoma interno presente en la secuencia de codificación de T7ClfA(N123)Y338A de pLP1171 se alteró mediante mutaciones silenciosas en posiciones de ADN 339 y 342 del ORF T7 rClfA Y338A, que cambia de G a T y G a A, respectivamente. El plásmido resultante, pLP1176, se usó a continuación para eliminar los residuos externos, originalmente derivados de pQE30Clf40, entre la etiqueta T7 y el inicio de la región de codificación de ClfA. Los tres residuos de C-terminal derivados de ligador se eliminaron también en este momento.

145

[0200] El rClfA expresado mediante el plásmido resultante, pLP1179 (figuras 2 y 3), contiene sólo los 11 aminoácidos de N-terminal fusionados a residuo 40 a 559 de ClfA(N123)Y338A. La secuencia de ADN de la región que comprende el promotor T7 y la secuencia de codificación de T7 rClfA(N123)Y338A de pLP1179 es SEQ ID n.º 124.

Cepas bacterianas y Plásmidos

[0201] La pET9a de estructura principal de plásmido (que se obtiene a partir de Novagen) se usó para la construcción de pLP1179, que expresa T7ClfA(N123)Y338A a partir de un promotor T7. El plásmido contiene el gen de resistencia de kanamicina (KanR) para selección positiva. La cepa de E. coli huésped BL21(DE3) [F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm (DE3)] (Novagen) se usó originalmente para obtener la expresión de T7ClfA(N123)Y338A. La designación DE3 indica el lisogen lambda con contenido en la gen de ARN polimerasa T7 bajo el control del promotor lacUV5 (inducible por IPTG) que se usa para la expresión inducida de ARN polimerasa de T7 y la transcripción posterior a partir del promotor T7 proximal a la secuencia de codificación de ClfA(N123)Y338A presente en pLP1179. Tras recibir información de que la cepa huésped lisogénica BL21(DE3) es capaz de inducción de fago de lisis tras fermentaciones a gran escala, la cepa huésped se cambió a la cepa huésped recA BLR(DE3) [F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm Δ(sri-recA)306::Tn10(TcR) (DE3)] (Novagen).

Producción y Purificación de ClfA

[0202] Para la producción de ClfA, se hizo que BLR(DE3) de E. coli/pLP1179 creciera en medio definido en modo por lote alimentado por glucosa en biorreactores. Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica (DO 600) de

entre 30 y 50, la expresión de ClfA se indujo mediante la adición de IPTG. El cultivo se recolectó entre 3 a 16 horas después de la inducción.

[0203] Las células se vieron afectadas y la fracción soluble clarificada se recogió. Después de la adición de sulfato de amonio, el material se aplicó a una columna con contenido en resina Fenil-Sepharose y se eluyó. Las fracciones con contenido en ClfA se identificaron, se dializaron y se cargaron en una columna de intercambio aniónico (Q-Sepharose). Después de la elución con un gradiente de sal, las fracciones con contenido en ClfA se identificaron, se concentraron mediante ultrafiltración y se cargaron en una columna de exclusión molecular (Superdex-75). Las fracciones con contenido en ClfA se identificaron y se agruparon. La pureza del ClfA en este punto fue de aproximadamente un 98 % tal como se mide por SDS-PAGE.

Clonificación y Purificación de ClfB N1N2N3

[0204] La secuencia de codificación de ClfB que se corresponde con residuos de aminoácido 44 a 542 se clonó en un vector de expresión de ARN polimerasa de T7, pET28a (Novagen) para proporcionar un plásmido pPX1189. El vector de expresión se transformó en BLR(DE3) de E. coli (Novagen) para la producción de ClfB recombinante. (Véase Walsh, y col., Microbiology 154: 550 a 558 (2008)).

[0205] Para la producción de ClfB, se hizo que BLR(DE3) de E. coli/pLP1179 creciera en un medio definido en modo por lote alimentado por glucosa en biorreactores. Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica (DO 600) de entre 30 y 50, la expresión de ClfB se indujo mediante la adición de IPTG. El cultivo se recolectó entre 3 a 16 horas después de la inducción.

[0206] Las células se vieron afectadas y la fracción soluble clarificada se recogió. El pH de la fracción soluble se ajustó a un pH de aproximadamente 3,2 y las impurezas precipitadas se eliminaron. El pH de la fracción soluble con contenido en ClfB se reajustó a un pH de aproximadamente 8,0 y se dializó para eliminar sales. Después de la adición de sulfato de amonio, el material se aplicó a una columna con contenido en resina Fenil-Sepharose y se eluyó. Las fracciones con contenido en ClfB se identificaron, se dializaron y se cargaron en una columna de intercambio aniónico (Q-Sepharose). Después de la elución con un gradiente de sal, las fracciones con contenido en ClfB se identificaron, se concentraron mediante ultrafiltración y se cargaron en una columna de exclusión molecular (Superdex-75). Las fracciones con contenido en ClfB se identificaron y se agruparon. La pureza del ClfB en este punto fue de aproximadamente un 94 % tal como se mide por SDS-PAGE.

Ejemplo 2: Producciones de Antigenos: MntC de Staph Aureus

Clonificación de MntC Lipidada de S. aureus

[0207] MntC recombinante se clonó originalmente a partir de la cepa de S. aureus Mu50. La secuencia de codificación de rMntC se amplificó mediante PCR a partir de ADN genómico de Mu50 de S. aureus. Dos pares de cebadores anidados se usaron para la amplificación (tabla 2). El primer par de cebadores, en el sentido de 5'SA926-MntC y en el sentido de 3'SA926-MntC, se alinean con la secuencia en el sentido de 5' y en el sentido de 3' del marco de lectura abierto de rMntC. El segundo conjunto de cebadores se alinean con la secuencia de codificación de rMntC permitiendo amplificar la secuencia que se corresponde con residuos de aminoácido 19 a 309. Sitios

de enzimas de restricción se incorporaron en los extremos de 5' de estos cebadores para facilitar la clonificación direccional. Se llevó a cabo una PCR en un Termociclador de Peltier (MJ Research Inc, Walthan, MA) con una Premezcla de ADN Polimerasa TaKaRa PrimeSTAR HS (Takara Bio USA, Madison, WI). El producto de PCR se purificó mediante QIAEX II (Qiagen, Valencia, CA), se escindió con las endonucleasas de restricción apropiadas (New England BioLabs, Ipswich, MA) y se subclonó en el vector de expresión accionado por promotor araBAD pBAD18Cm. Este vector también contiene el péptido señal de la lipoproteina P4 a partir de H. influenza. El producto de PCR de MntC se subclonó en marco en el sentido de 3' a partir del péptido señal P4 para crear pLP1194. La secuencia de ADN de la región de codificación MntC de pLP1194 se muestra en el SEQ ID n.º: 120. La MntC que se expresa a partir de pLP1194 es una lipoproteina. El ADN plásmido recombinante se secuenció mediante un ABI PRISM BigDyeTM Terminator V.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) y la proteína recombinante se expresó en BLR de E. coli (NOVAGEN) para la producción de rMntC lipidada.

Producción y Purificación de MntC Lipidada

[0208] Para la producción de MntC lipidada, se hizo que BLR de E. coli/pLP1194 creciera en un medio definido en modo por lote alimentado por glucosa en biorreactores. Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica (DO 600) de aproximadamente 60, la expresión de rMntC se indujo conmutando la alimentación a una mezcla de glucosa y arabinosa. El cultivo se recolectó aproximadamente 24 horas después de la inducción.

147

[0209] Las células se vieron afectadas y se recogió la fracción insoluble. MntC lipidada se encontró asociada con la membranas celulares debido a la modificación de lípido. MntC se extrajo a partir de la fracción de membrana con un detergente (Zwittergent ZW-312). Después de la eliminación del residuo insoluble, se encontró la MntC lipidada en la fracción soluble. La fracción soluble se aplicó a una columna con contenido en una resina de modo de mezclado y se eluyó con un gradiente de sal y pH lineal. Las fracciones con contenido en MntC se identificaron y se agruparon. Se añadió sulfato de amonio al conjunto y el material se aplicó a una columna con contenido en Butyl-Sepharose y se eluyó. Las fracciones con contenido en MntC se identificaron, se desalaron y se cargaron en una columna de intercambio catiónico (SP-Sepharose). Después de la elución con un gradiente de sal, las fracciones con contenido en rMntC se identificaron y se agruparon.

Clonificación de S. aureus MntC no lipidada

[0210] La secuencia de ADN empleada para expresar rMntC no lipidada se aisló por amplificación de PCR a partir de pLP1194 plásmido. La secuencia resultante se corresponde con residuos de aminoácido 19 a 309 y no contiene la secuencia señal que dirige la secreción y lipidación. La secuencia de ADN de la región de codificación rMntC de pLP1215 se encuentra en ADN SEQ ID n.º: 120.

[0211] Para crear pLP1215, MntC se amplificó mediante PCR a partir de pLP1194. La secuencia de ADN de MntC presente en pLP1215 se corresponde con residuos de aminoácido 19 a 309 y El primer codón para este constructo se introdujo en el cebador directo que se usa en la

amplificación del gen. Los cebadores que se usan para PCR también contienen sitios de enzimas de restricción en los extremos de 5' para facilitar la clonificación direccional (tabla 2). La PCR y purificación del gen amplificado se llevó a cabo tal como se describe anteriormente. Producto de PCR purificado se escindió con las endonucleasas de restricción apropiadas (New England BioLabs, Ipswich, MA) y se subclonó en el promotor vector de expresión accionado por T7 pET28a (Novagen, Madison, WI). El ADN de plásmido recombinante pLP1215 se secuenció mediante un ABI PRISM BigDyeTM Terminator V.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) y la proteína recombinante se expresó en BLR(DE3) de ADN de plásmido de E. coli. para pLP1215 se purificó y se usó para transformar E. coli HMS174(DE3) para evaluar la expresión de proteínas.

Tabla 2: Cebadores de MntC.

Constructos de Expresión	Nombre del cebador	Secuencia (5'-3')
MntC lipidada (pLP1194)	5'SA926-MntCups	CAC AAA ATT TAC GAA ETIQUETA AAA GAA ACG AG (SEQ ID n.º: 109)
	3'SA926-MntCdown	AAA ATA TTG GAG ATA CCA ATA TTT ETIQUETA GTT G (SEQ ID n.º: 110)
	5'BamHISA926_MntC	TTT CTT GGA TCC GGT ACT GGT GGT AAA CAA AGC AGT G (SEQ ID n.º: 111)
	3'SphISA926_MntC	TTT CTT GCA TGC TTA TTT CAT GCT TCC GTG TAC AGT TTC (SEQ ID n.º: 112)
MntC no lipidada (pLP1215)	5'NcoIMntC	TTT CTT CCA TGG GTA CTG GTG GTA AAC AAA GCA G (SEQ ID n.º: 113)
	3'BlpIMntC	TTT CTT GCT CAG CAT TAT TTC ATG CTT CCG TGT ACA G (SEQ ID n.º: 114)

[0212] Los oligonucleótidos de síntesis que se usan para generar constructos de rMntC. Sitios de endonucleasa de restricción están subrayados. Los nucleótidos en negrita indican el primer codón para el constructo de rMntC no lipidado.

Producción y Purificación de RMntC no lipidada

[0213] Para la producción de rMntC no lipidada, se hizo que E. coli HMS174(DE3)/pLP1215 creciera en un medio definido en modo por lote alimentado por glucosa en biorreactores. Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica (DO 600) de aproximadamente 60 a 80, la expresión de rMntC se indujo mediante adición de IPTG. El cultivo se recolectó aproximadamente 24 horas después de la inducción. Las células se vieron afectadas y la fracción soluble clarificada se recogió. El lisado se aplicó a una columna con contenido en una resina de intercambio catiónico (SP-Sepharose) y se eluyó con un gradiente de sal lineal. Las fracciones con contenido en MntC se identificaron. Después de la adición de sulfato de amonio, el material se aplicó a una columna con contenido en resina Fenil-Sepharose y se eluyó. Después de la elución, las fracciones con contenido en rMntC se identificaron, se agruparon, y se desalaron. La pureza de la rMntC en este punto fue de > 95 % tal como se mide por SDS-PAGE.

Ejemplo 3: Producción de Polisacáridos de cápsula CP5 y CP8

[0214] En el presente ejemplo, se describe la producción de varios tamaños de polisacáridos de cápsula de tipo 5 y 8 de S. aureus. Las estructuras de los polisacáridos CP5 y CP8 se muestran en la figura 4. Los procedimientos que se describen en el presente documento son eficaces para producir CP5 y CP8 con pesos moleculares que varían de aproximadamente 50 kDa a 800

kDa. En base a las características de crecimiento y a la cantidad de cápsula que se produce, la cepa PFESA0266 se eligió para producción de CP5 mientras que se usaron unas cepas PFESA0005 o PFESA0286 para la producción de CP8. Las cápsulas aisladas a partir de las cepas PFESA0005 y PFESA0286 mostraron que eran idénticas.

[0215] Para la producción de polisacáridos capsulares, se hizo que las cepas crecieran en un medio complejo que consistía principalmente en una fuente de carbono (o bien lactosa o bien sacarosa), harina de soja hidrolizada como la fuente de nitrógeno, y trazas de metales. Se hizo que las cepas crecieran en biorreactores durante de 2 a 5 días.

[0216] La purificación de CP5 y CP8 que se usa para la preparación de conjugados se realizó mediante dos procedimientos diferentes que se basan en una temperatura elevada y en un pH bajo para efectuar la liberación de cápsula a partir de la célula y reducir el peso molecular del polisacárido. El peso molecular resultante depende del momento, la temperatura y el pH de la etapa de hidrólisis.

[0217] La caracterización de CP5 y CP8 se realizó usando las técnicas que se especifican en la tabla 3. Los polisacáridos de cápsula que se producen mediante el presente procedimiento dan como resultado polisacáridos puros con bajos niveles de proteína, NA, peptidoglicano y TA contaminantes. Véanse las tablas 4 y 5.

Tabla 3: Ensayos de caracterización para CP5 y CP8 de S. aureus purificado

Especificidad	Ensayo
Proteína residual	ensayo colorimétrico de Lowry
Ácidos nucleicos residuales	barrido de 260nm
Ácido teicoico residual	ensayo colorimétrico de fosfato
Peptidoglicano residual	HPAEC-PAD
Tamaño	SEC-MALLS
Composición	HPAEC-PAD
Identidad	1H-RMN o reacción con AcM específico
O-acetilación	1H-RMN
Concentración	MALLS-RI o HPAEC-PAD

[0218] En el primer procedimiento, a continuación de la liberación de la cápsula a partir de la célula y de la reducción de peso molecular, la preparación de cápsula se trata con un cóctel de enzimas (ribonucleasa, desoxiribonucleasa, lisozima, y proteasa) para digerir impurezas. Después de la incubación, las impurezas residuales se precipitan mediante la adición de etanol (concentración final de aproximadamente un 25 %). Después de la eliminación del etanol residual, disolución con contenido en cápsula se cargó en una columna de intercambio aniónico (Q-Sepharose) y se eluyó con un gradiente de sal lineal. Las fracciones con contenido en cápsula se agruparon y se trataron con metaperyodato de sodio. Este tratamiento dio como resultado la hidrólisis oxidativa del contaminante de ácido teicoico residual, pero no afectó al CP5 o CP8. La reacción se extinguió mediante la

adición de etilenglicol. El material se concentró y se diafiltró frente a dH20 para eliminar cualesquiera productos secundarios y reactivos residuales.

[0219] El segundo procedimiento se usó para producir cápsulas did not involve el uso de enzimas para digerir las varias impurezas derivadas de célula. En el presente procedimiento, a continuación de la liberación de la cápsula a partir de la célula y de la reducción de peso molecular el caldo de fermentación hidrolizado se clarificó por microfiltración seguida por ultrafiltración y diafiltración. La disolución se trató con carbono activado para eliminar impurezas. Después del tratamiento de carbono, el material se trató con metaperyodato de sodio para oxidar el ácido teicoico residual seguido por una extinción con propilenglicol. El material se concentró y se diafiltró frente a dH2O para eliminar cualesquiera productos secundarios y reactivos residuales.

[0220] Cápsulas que se produce usando cualquiera de los procedimientos dan como resultado polisacáridos puros con bajos niveles de contaminantes de proteína, ácido nucleico y ácido teicoico. Los procedimientos que se describen pueden usarse para producir unos intervalos específicos de los polisacáridos de alto peso molecular deseados simplemente variando las condiciones de hidrólisis. Un intervalo particularmente ventajoso de polisacáridos de alto peso molecular, variando de 70 a 150 kDa, es útil para fabricar composiciones inmunogénicas conjugando polisacárido con una proteína de portador.

[0221] Ejemplos de polisacárido de cápsula de alto peso molecular que pueden obtenerse mediante los procedimientos que se describen en el presente documento se muestran en la tabla 4 a continuación. Los lotes de

CP5 de más alta MW purificado también tenían una alta pureza tal como se indica por no TA, peptidoglicano y proteína residual baja. Véase la tabla 4. El intervalo de pesos moleculares en esos ejemplos abarcaba de 132,7 kDa a 800 kDa y los polisacáridos purificados estaban muy O-acetilados, variando de un 90 a un 100 %, y un 100 % para la N-Acetilación. Véase la tabla 4.

[0222] Ejemplos de polisacárido de cápsula de peso molecular más bajo que pueden obtenerse mediante los procedimientos que se describen en el presente documento se muestran en la tabla 5 a continuación. Los lotes de CP8 de más baja MW purificado tenían una alta pureza tal como se indica por la ausencia de ácido teicoico (TA), peptidoglicano y proteína residual baja. Véase la tabla 5. El intervalo de pesos moleculares más bajos abarcaba de 20,4 kDa a 65,1 kDa y los polisacáridos purificados estaban muy O-acetilados, variando de 75 a 96 %. Los niveles de contaminación de ácido nucleico eran bajos, variando de un 0,5 % a un 2,45 %. Véase la tabla 5.

Tabla 4: Caracterización de Preparaciones de CP5

SA CP-5	MW (kDa)	CP (mg/ml)	O-Acetilo (%) RMN	Identidad RMN	N-acetil (%) RMN
1	800,1	3,164	100	Pass	100
2	132,7	1,172	90	Pass	100
3	335,4	0,975	90	Pass	100
4	366,8	0,865	90	Pass	ND

Tabla 5: Caracterización de preparaciones de CP8

SA CP-8	CP Purificado Total mg	MW(kDa) (g/mol)	Proteína (Lowry) % (p/p)	NA (barrido de 260nm) % (p/p)	O-Acetilo RMN %
5	310	27,0	1,2	0,94	100
6	438	29,0	2,4	2	100
7	179	20,4	0,37	0,12	108
8	101	46,9	Bajo el umbral de detección	0,5	94
9	91	65,1	1,15	2,45	96
10	578	35,5	2,47	0,65	75

Selección de peso molecular de los polisacáridos capsulares

[0223] Este análisis cinético muestra que un amplio intervalo de pesos moleculares de polisacáridos de cápsula puede generarse mediante los procedimientos que se describen en el presente documento. Inicialmente, se produjeron unos polisacáridos más grandes mediante las células bacterianas, y posteriormente, un intervalo de peso molecular deseado puede seleccionarse y a continuación purificarse mediante la manipulación del pH y las condiciones de calor de las etapas de calentamiento y de hidrólisis.

[0224] El tratamiento térmico del caldo de fermentación de S. aureus era una etapa de proceso entre la fermentación y recuperación de CP. Esta etapa de proceso usa calor para tratar el caldo de pH ajustado durante un periodo especificado. Los fines del tratamiento térmico a un pH bajo eran destruir células, inactivar enterotoxinas, liberar polisacárido unido a célula, y reducir el peso molecular al tamaño deseado. Entre estos fines, la reducción de

peso molecular era la menor en términos de tiempo de procesamiento requerido en esta etapa. Por lo tanto, los otros fines se lograron de forma inevitable dentro del plazo de tiempo del tratamiento considerado.

Tratamiento térmico

[0225] Se determinaron temperatura y pH condiciones para seleccionar varios intervalos de peso molecular de los polisacáridos de cápsula. El pH del caldo se ajustó con ácido sulfúrico concentrado. A continuación, la temperatura del caldo se elevó hasta el valor fijado. El tiempo de tratamiento térmico empezó en cuanto la temperatura alcanzó el punto fijado. Cuando se alcanzó el tiempo de tratamiento deseado, el caldo se enfrió hasta temperatura ambiente. Se tomaron muestras en procedimiento para determinar la concentración de polisacárido y el peso molecular mediante sistemas de HPLC y SEC-MALLS, respectivamente. Los datos de MW se usaron en el análisis cinético. Los perfiles de MW se determinaron a lo largo del tiempo de CP5 a un pH de 4,0, 4,5 y 5,0 y CP8 a un pH de 3,5, 4,0, y 5,0. Véase las figuras 5A y 5B.

[0226] La cinética de hidrólisis ácida suave de polisacáridos se realizó usando purificado CP-5 y CP-8 que se obtiene a partir del procedimiento. La disolución de polisacárido purificado se ajustó al pH deseado para el experimento con ácido sulfúrico. Las muestras se colocaron en un baño de aceite equipado con un sistema de control de la temperatura de precisión. Cada muestra se extrajo a un intervalo de tiempo predeterminado y se extinguió en un cubo de hielo. Al final del experimento, una alícuota de tampón Tris 1 M (pH 7,5) se añadió a la muestra para ajustar el pH de nuevo a aproximadamente 7. Las muestras se analizaron mediante un sistema

SEC-MALLS. Los datos de MW se usaron en el análisis cinético. El efecto de la temperatura sobre MW perfiles de CP5 a un pH de 4,5 y CP8 a un pH de 3,5 se determinó a lo largo del tiempo. Véase las figuras 6A y 6B. Este procedimiento de hidrólisis ácida puede implementarse usando el fermentador cultivo o a una fase de purificación intermedia o, tal como se muestra en este caso, usando el polisacárido purificado. Otras etapas de reducción de peso molecular, tal como sonicación o sheer, puede implementarse de forma similar.

Resultados

[0227] El efecto de pH tras la reducción de MW en un tratamiento térmico se muestra en las figuras 5A y 5B para CP-5 y CP-8, respectivamente. Puede observarse que un pH más bajo era más eficaz para reducir el tamaño de polisacárido. Los datos también sugieren que CP-5 era más difícil de hidrolizar que CP-8 al mismo pH. Considerando los perfiles de CP8, pueden generarse intervalos de pesos moleculares de entre 300 kDa y 600 kDa usando un pH de 5 a 95 °C durante entre 15 minutos y 120 minutos. De forma similar, elegir un pH de 4 a 95 °C durante entre 15 minutos y 120 minutos puede proporcionar unos intervalos de peso molecular de polisacárido CP8 de entre 250 kDa y 450 kDa. Además, elegir un pH de 3,5 a 95 °C durante entre 15 minutos y 120 minutos puede proporcionar unos intervalos de peso molecular de polisacárido CP8 de entre 120 kDa y 450 kDa.

[0228] El efecto de la temperatura sobre la reducción de MW se realizó usando los polisacáridos purificados recuperados a partir del procedimiento de recuperación. Los resultados se muestran en las figuras 6A y 6B. Tal

como se muestra, cuanto más alta es la temperatura, más rápida es la velocidad de hidrólisis y más amplio es el intervalo de los pesos moleculares de polisacárido que se produce con el tiempo. El uso de una temperatura más baja, de 55 °C frente a 95 °C al mismo pH, produce un intervalo más estrecho de pesos moleculares de polisacárido.

[0229] Además, la figura 7 muestra la correlación entre el peso molecular de purificado CP5 y CP8 con el tiempo de tratamiento para hidrólisis ácida suave. El polisacárido purificado es el producto final que se obtiene a partir del procedimiento de recuperación detallado anteriormente. Tal como se muestra en la figura 7, el aumento en el tiempo de tratamiento térmico de la cepa de S. aureus PFESA0266 a un pH de 4,5 da como resultado la generación de polisacáridos CP5 de peso molecular más pequeño, mientras que tiempos de tratamiento térmico más cortos a un pH de 4,5 dan como resultado la generación de polisacáridos CP5 de peso molecular más alto. El tamaño de los polisacáridos CP5 oscilaba de aproximadamente 90 kDa a aproximadamente 220 kDa dependiendo de la duración del tiempo de tratamiento térmico a un pH bajo (4,5). De forma similar, el aumento en el tiempo de tratamiento térmico de la cepa S. aureus PFESA0005 a un pH de 3,5 da como resultado la generación de polisacáridos CP8 de peso molecular más bajo, mientras que tiempos de tratamiento térmico más cortos a un pH de 3,5 dan como resultado la generación de polisacáridos CP8 de peso molecular más alto. El tamaño de los polisacáridos CP8 oscilaba de aproximadamente 80 kDa a aproximadamente 220 kDa dependiendo de la duración del tiempo de tratamiento térmico a un pH bajo (3,5). La correlación entre el momento de tratamiento térmico a un pH bajo y el tamaño de los

153

polisacáridos CP5 y CP8 purificados, tal como se muestra en el presente estudio, permite una estimación del tiempo de tratamiento requerido para producir polisacárido purificado con un intervalo especificado de peso molecular.

[0230] Es importante indicar que, tal como se muestra anteriormente, puede producirse, liberarse y purificarse el intervalo completo de pesos moleculares de polisacáridos de cápsula para tanto CP5 como CP8 de 20 kDa a más de 800 kDa. Los procedimientos que se describen pueden usarse para producir unos intervalos específicos de polisacáridos de cápsula de alto peso molecular deseados. Un intervalo particularmente ventajoso de alto peso molecular cápsula polisacárido tipo 5 y tipo 8 puede generarse a partir de estos procedimientos que tienen pesos moleculares que varían de 70 a 150 kDa. Véase la tabla 6. Este intervalo de pesos moleculares de polisacárido de cápsula es útil para fabricar composiciones inmunogénicas conjugando el polisacárido con una proteína de portador. Alternativamente, este intervalo ventajoso de polisacárido de cápsula de alto peso molecular varía de 80 a 140 kDa de CP5 y CP8. Véase la tabla 6. Otro intervalo ventajoso de polisacárido de cápsula CP5 y CP8 de alto peso molecular va de 90 a 130 kDa, o de 90 a 120 kDa de CP5 y CP8. Véase la tabla 6. Las condiciones que se usan para generar el polisacárido de cápsula CP5 que tiene un intervalo de peso molecular de aproximadamente 100 a 140 kDa son tal como sigue: 95 °C, pH 4,5 durante 135 minutos. Las condiciones que se usan para generar el polisacárido de cápsula CP8 que tiene un intervalo de peso molecular de aproximadamente 80 a 120 kDa son tal como sigue: 95 °C, pH 3,5 durante 300 minutos.

Tabla 6: Producción de intervalo específico de CP5 y CP8 de alto peso molecular

Pase	CP8 MW (kDa)	CP5 MW (kDa)
1	98	142
2	89	108
3	108	142
4	108	108
5	89	ND
6	100	ND
7	99	63
8	113	72
9	105	74
10	100	63
11	87	ND

ND = no realizado

Ejemplo 4: Conjugación de Polisacáridos de cápsula CP5 y CP8 con CRM_{197}

[0231] El presente ejemplo describe procedimientos y ensayos de caracterización que se usan en la producción de CP5-CRM_{197} y CP8-CRM_{197} de S. aureus conjugados. Varias químicas de conjugación se evaluaron para conjugar polisacáridos de cápsula CP5 y CP8 de S. aureus con una proteína de portador. La conjugación usando PDPH (3-2-piridilditio)-propionil-hidrazida) da como resultado enlace tioéter covalente y CDI/CDT (1,1-carboildiimidazol/1,1-carboil-di-1,2,4-triazol) da como resultado un ligador de un carbono o de cero carbonos entre CP y proteína de portador.

Conjugación de CP con CRM_{197} mediante química de conjugación de PDPH

154

[0232] La química de conjugación de PDPH es un procedimiento de múltiples etapas que implica la activación del polisacárido, la eliminación del grupo protector de tiol, la purificación del producto intermedio de polisacárido activado, la activación y la purificación de la proteína CRM_{197}, y la conjugación de los componentes activados seguido por purificación. Después de la introducción de un grupo tiol con contenido en ligador en el polisacárido y un grupo haloacetilo en el portador de proteína CRM_{197}, CP5 de S. aureus y polisacáridos CP8 se unieron al portador de proteína a través de un enlace tioéter. Se introdujeron grupos bromoacetilo en la proteína CRM_{197} mediante reacción de grupos amina con el éster de N-hidroxisuccimida de ácido bromoacético. Para generar CP tiolado, los grupos carboxilato activados de carbodiimida de ácido N-acetilmannosaminourónico en CP se acoplaron con el grupo hidrazida del ligador heterobifuncional de hidrazida reactiva-sulfhidrilo 3-(2-piridilditio)-propionil-hidrazida (PDPH). Tioles de PDPH-CP tiolado, generados mediante reducción con DTT y purificados mediante SEC en una columna Sephadex G25, reaccionaron con los grupos bromoacetilo de proteína activada dando como resultado enlace covalente de tioéter formado mediante desplazamiento de bromo entre CP y la proteína. Los grupos bromoacetilo sin reaccionar se "taparon" con clorhidrato de cisteamina (clorhidrato de 2-aminoetanotiol). La mezcla de reacción se concentró a continuación y se sometió a diafriltración. Los grupos bromoacetilo no conjugados restantes se taparon con clorhidrato de cisteamina para garantizar que no quedaba ningún grupo bromoacetilo reactivo tras la conjugación. Éste formó un enlace covalente entre el extremo

de tiol de cisteamina y el grupo acetilo en el residuo de lisina tras el desplazamiento de bromo.

Tiolación de polisacárido capsular de S. aureus con PDPH

[0233] El polisacárido se activó en primer lugar mediante tiolación con PDPH. Se mezcló el polisacárido con una disolución madre de PDPH recién preparada (250 mg/ml en DMSO), una disolución madre de EDAC (90 mg/ml en diH2O), y disolución madre de tampón MES (0,5 M, pH 4,85) para fabricar la disolución final 0,1 M de MES, y 2 y 4 mg CP/ml a la vez que se mantiene a una razón en peso CP:PDPH:EDAC de 1:5:3 para CP 5 y 1:0,6:1,25 para CP 8. Se incubó esta mezcla durante 1 hora a temperatura ambiente y a continuación se dializó frente a un volumen 1000Xde H2O destilada cuatro veces usando un dispositivo de diálisis 3500 MWCO a entre 4 y 8 °C para eliminar PDPH sin reaccionar. El polisacárido unido a PDPH se hizo DTT 0,2 M y se incubó a temperatura ambiente durante 3 horas o durante la noche a entre 4 y 8 °C. Se separaron el DTT en exceso así como los productos secundarios de la reacción del sacárido activado mediante SEC usando resina Sephadex G25 y agua destilada como la fase móvil. Las fracciones se sometieron a ensayo mediante el ensayo de DTDP para grupos tiol y se agruparon las fracciones positivas que eluían cerca del volumen vacío de la columna. Se sometió a ensayo el conjunto de fracciones mediante los ensayos de PAHBAH y de O-acetilo para determinar el grado de activación que se expresa como un porcentaje molar de las unidades de repetición con contenido en un grupo tiol (concentración molar de tioles/concentración molar de las unidades de repetición). Se liofilizó el

polisacárido activado y se almacenó a -25 °C hasta que era necesario para la conjugación.

Activación de proteína de portador

[0234] Por separado, se activó la proteína de portador mediante bromoacetilación. CRM_{197} se diluyó hasta 5 mg/ml con NaCl al 0,9 % tamponado con fosfato 10 mM pH 7 (PBS) y a continuación se hizo NaHCO3 0,1 M pH 7,0 usando disolución madre 1 M. El éster de N-hidroxisuccinimida del ácido bromoacético (BAANS) se añadió a una razón CRM_{197} :BAANS 1:0,25 (p:p) usando una disolución madre de BAANS de DMSO 20 mg/ml. Esta mezcla de reacción se incubó a entre 4 y 8 °C durante 1 hora a continuación se purificó usando SEC sobre Sephadex G-25. El CRM_{197} activado purificado se sometió a ensayo mediante el ensayo de Lowry para determinar la concentración de proteína y a continuación se diluyó con PBS hasta 5 mg/ml. Se añadió sacarosa a un 5 % p/vol como un crioprotector y se congeló la proteína activada y se almacenó a -25 °C hasta que era necesaria para la conjugación.

Reacción de acoplamiento

[0235] Una vez se prepararon el polisacárido de cápsula activado y la proteína de portador activada, se combinaron los dos en una reacción de conjugación. Se disolvió el polisacárido tiolado y liofilizado en borato 0,16 M pH 8,95, se mezcló CRM_{197} bromoacetilado descongelado y agua destilada para fabricar la disolución final de borato 0,1 M, razón 1:1 en p/p de CRM_{197}:CP, y polisacárido 1 mg/ml para CP8 y 2 mg/ml polisacárido para CP5. Se incubó esta mezcla a temperatura ambiente durante entre 16 y 24 horas. Se taparon los grupos bromoacetilo sin reaccionar en la proteína

añadiendo clorhidrato de cisteamina en una razón de CRM_{197}:cisteamina de 1:2 (p/p) usando una disolución 135 mg/ml de cisteamina disuelta en borato 0,1 M pH 8,95 y se incubó durante 4 horas a temperatura ambiente. El conjugado de polisacárido de cápsula-CRM_{197} (conjugado) se purificó mediante diafiltración 50 veces frente a NaCl al 0,9 % usando un ultrafiltro de polietersulfona de 100K.

[0236] Los resultados de la reproducibilidad de estudios de tiolación de CP5 y CP8 con PDPH mostraron que el grado de activación de CP5 estaba en el intervalo 11 a 19 % lo que corresponde a aproximadamente una molécula de ligador unida por diez unidades de repetición de CP a una molécula de ligador por cinco unidades de repetición. La activación de CP8 estaba en el intervalo de 12 a 16 %, lo que era muy similar a la activación de CP5.

[0237] La bromoacetilación de residuos de lisina de CRM_{197} fue muy consistente, dando como resultado la activación de 19 a 25 lisinas de las 39 lisinas disponibles. La reacción produjo altos rendimientos de proteína activada.

Conjugación de CP con CRM_{197} mediante química de conjugación de CDI/CDT

[0238] CDI y CDT proporcionan un procedimiento de conjugación de una sola etapa en el que el polisacárido se activa en un entorno anhidro (DMSO) para formar imidazol o restos de carbamato de triazol con restos acilimidazol o aciltriazol e hidroxilos disponibles con ácidos carboxílicos. La adición de un portador de proteína (en DMSO) conduce al desplazamiento nucleofílico del imidazol o triazol mediante lisinas y la formación de un enlace de carbamato (para hidroxilos activados) y el enlace de amida (para ácidos carboxílicos

156

activados). Se diluye la disolución de reacción 10 veces en una disolución acuosa para eliminar grupos de activación sin reaccionar y a continuación purificarse mediante diafiltración.

[0239] Las dos químicas de conjugación que se produce CP con enlace covalente con la proteína de portador, que se indicaba por la presencia del sacárido y la proteína en las fracciones en cromatografía de exlusión molecular, y mediante análisis de aminoácidos de conjugado de clorhidrato de cisteamina tapado o glicolaldehído tapado.

[0240] Resumen de los resultados de la preparación de varios lotes de conjugados preparados mediante químicas tanto de PDPH como de CDI/CDT para ambos serotipos capsulares con tamaño de polisacárido en el intervalo de 20 a 40 kDa se muestran en la tabla 7 a continuación. No hubo diferencias significativas en el polisacárido de cápsula libre, razón de CP-proteína y rendimientos de conjugados generados mediante estos dos procedimientos de conjugación. La antigenicidad de CP conjugado no se vio alterada por la conjugación tal como se representa mediante la línea de precipitinas de identidad entre conjugados y CP nativo.

Tabla 7: Caracterización de Preparado de CP5-CRM_{197} y CP8-CRM_{197} SA mediante dos químicas de conjugación

Conjugado	Química	Rendimiento de CP (%)	Rendimiento de proteína (%)	Razón de rendimiento	Sacárido libre (%)	Proteína libre (%)	Lisinas modificadas
CP5-	CDT	19-27	35	0,5-0,8	10-40	< 1	18-22

Conjugado	Química	Rendimiento de CP (%)	Rendimiento de proteína (%)	Razón de rendimiento	Sacárido libre (%)	Proteína libre (%)	Lisinas modificadas
CRM_{197} SA							
	PDPH	26-52	40-99	0,4-1,0	23-50	ND	ND
CP8-CRM_{197} SA	CDI	46-62	54-55	0,8-0,9	22-25	< 1	7-8
	PDPH	34-70	61-83	0,6-0,9	15-41	ND	11-16

[0241] Tal como se muestra anteriormente, los procedimientos que se describen en el presente documento pueden usarse para producir unos intervalos específicos de polisacáridos de cápsula de alto peso molecular deseados. El objeto del presente estudio era preparar conjugados a partir de un intervalo preseleccionado de alto pesos moleculares de CP que pudiera ser filtrado y purificado para su uso en composiciones inmunogénicas. En el presente ejemplo, ocho lotes en los que el polisacárido de cápsula CP5 variaba en peso molecular de aproximadamente 90 kDa a aproximadamente 120 kDa se seleccionaron y se realizó la conjugación usando activación con triazol (CDT). Véase la tabla 8. Los pesos moleculares de los conjugados resultantes oscilaban de 1.533 kDa a 2.656 kDa. El número de lisinas

conjugadas por CRM_{197} oscilaba de un alto número de 22 a un bajo número de 15. El polisacárido de cápsula libre oscilaba de un alto número de un 18 % a un bajo número de un 11 %. Véase la tabla 8.

Tabla 8 Conjugados Con Intervalo de MW Preseleccionado de CP5

Pase	Poli, MW (kDa)	Rendimiento de Sac (%)	Sacárido libre (%)	MW mediante SEC-MALLS (kDa)	Lisinas modificadas
1	121	63	11	2.130	19
2	92	72	16	1.533	22
3	119	74	14	2.656	15
4	115	63	18	1.911	15

[0242] La tabla 9 resume el análisis de conjugados de CP8 en los que el polisacárido de cápsula CP8 variaba en peso molecular de aproximadamente 87 kDa a 113 kDa y se utilizó la química de conjugación de imidazol. Los pesos moleculares de los conjugados resultantes oscilaban de 595 kDa a 943 kDa. El número de lisinas conjugadas por CRM_{197} oscilaba de un número alto de 9 a un número bajo de 3. El polisacárido de cápsula libre oscilaba de un número alto de un 6 % a un número bajo de un 2 %. Véase la tabla 9.

Tabla 9 Conjugados Con Intervalo de MW Preseleccionado de CP8

Pase	Poli, MW (kDa)	Rendimiento de Sac (%)	Sacárido libre (%)	MW mediante SEC-MALLS	Lisinas modificadas

				(kDa)	
1	99	88	6	943	4
2	113	73	5	841	3
3	105	79	3	719	7
4	100	86	2	630	9
5	87	90	3	595	6

[0243] Ambas químicas de conjugación producen CP con enlace covalente con proteína de portador. No hubo diferencias significativas en polisacárido de cápsula libre, razón de CP-proteína y rendimientos de conjugados generados mediante estos dos procedimientos.

Ejemplo 5: Diversidad de Secuencia de Fragmentos de polipéptido N1, N2 y N3 de ClfA

[0244] En el presente ejemplo se evaluó la heterogeneidad de secuencia de proteína de fragmentos de polipéptido de ClfA N1, N2 y N3 a partir de aislados que dan lugar a enfermedad que se obtienen a partir de varias fuentes. Los genes de ClfA se secuenciaron a partir de las cepas de S. aureus asociadas con múltiples estados patológicos. La información de secuencia a partir de cepas adicionales se obtuvo a partir de GenBank para generar secuencias a partir de cepas relevantes. La tabla 10 enumera diferentes secuencias de ClfA.

[0245] El alineamiento de secuencia de proteínas de ClfA a partir de diferentes cepas que dan lugar a enfermedad de S. aureus se muestra en la figura 8A a 8E. Las secuencias de proteína se alinearon usando MUSCLE. Véase Edgar, R.C. Nucleic Acids Research 32 (5):1792 a 1797 (2004). Los alineamientos se mostraron usando SHOWALIGN. Véase Rice, P. y col.,

158

"EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite" Trends in Genetics, 16 (6): 276 a 277 (2000). Muchas de las secuencias se repitieron múltiples veces sin variación. Por motivos de claridad, cada secuencia única se colocó en el alineamiento sólo una vez. Véase la figura 8A a 8E. Sólo se incluyeron secuencias únicas en el listado de secuencia. Por ejemplo, la secuencia de proteína de ClfA_001 se obtuvo a partir de múltiples cepas diferentes sin variación alguna. Véase la figura 8A a 8E. El número de listado de secuencia para cualquier secuencia puede también obtenerse a partir de la tabla 10: Listados de secuencia y cepas de ClfA. La tabla 10 enumera una cepa a modo de ejemplo que contenía esta misma secuencia de proteína ClfA_001. Esta secuencia se muestra en la primer fila del alineamiento en la figura 8A a 8E. Este alineamiento de secuencias únicas del antígeno de ClfA indica que los polimorfismos se distribuyeron a lo largo de la totalidad de la región A (N1-N2-N3) de ClfA. En algunos casos, para cualquier secuencia de proteína de ClfA única dada, se descubrió más de una secuencia de nucleótidos, que codifica la misma proteína. Sólo la secuencia de ADN de aparición más frecuente se incluyó en el listado de secuencia y en la tabla 10. Para ClfA, las siguientes secuencias se dan a conocer en el presente documento y no se encuentran en GenBank: ClfA_003, ClfA_005, ClfA_008, ClfA_009, ClfA_013, ClfA_014, ClfA_015, ClfA_016, ClfA_017, ClfA_018, ClfA_019, ClfA_020, ClfA_021, ClfA_022, ClfA_023, y ClfA_024.

Tabla 10: Listados de secuencia y cepas de ClfA

Cepa a modo de Ejemplo	ADN-ClfA	NT SEQ ID n.º:	Proteína-ClfA	AA SEQ ID n.º:	% Identidad a Antígeno

Cepa a modo de Ejemplo	ADN-ClfA	NT SEQ ID n.º:	Proteína-ClfA	AA SEQ ID n.º:	% Identidad a Antígeno
PFESA0131	clfA_001-1	61	clfA_001	62	99
PFESA0074	clfA_002-1	63	clfA_002	64	92
PFESA0072	clfA_003-1	65	clfA_003	66	99
PFESA0159	clfA_004-1	67	clfA_004	68	94
PFESA0154	clfA_005-1	69	clfA_005	70	91
PFESA0096	clfA_006-1	71	clfA_006	72	91
PFESA0269	clfA_007-1	73	clfA_007	74	91
PFESA0081	clfA_008-1	75	clfA_008	76	97
PFESA0005	clfA_009-1	77	clfA_009	78	95
PFESA0139	clfA_010-1	79	clfA_010	80	99
PFESA0237	clfA_011-1	81	clfA_011	82	100

159

Cepa a modo de Ejemplo	ADN-ClfA	NT SEQ ID n.º:	Proteína-ClfA	AA SEQ ID n.º:	% Identidad a Antígeno
PFESA0157	clfA_012-1	83	clfA_012	84	96
PFESA0069	clfA_013-1	85	clfA_013	86	92
PFESA0002	clfA_014-1	87	clfA_014	88	98
PFESA0147	clfA_015-1	89	clfA_015	90	91
PFESA0094	clfA_016-1	91	clfA_016	92	98
PFESA0143	clfA_017-1	93	clfA_017	94	97
PFESA0129	clfA_018-1	95	clfA_018	96	99
PFESA0128	clfA_019-1	97	clfA_019	98	92
PFESA0148	clfA_020-1	99	clfA_020	100	91
PFESA0140	clfA_021-1	101	clfA_021	102	98
PFESA0152	clfA_022-1	103	clfA_022	104	91

Cepa a modo de Ejemplo	ADN-ClfA	NT SEQ ID n.º:	Proteína-ClfA	AA SEQ ID n.º:	% Identidad a Antígeno
PFESA0141	clfA_023-1	105	clfA_023	106	96
PFESA0160	clfA_024-1	107	clfA_024	108	94

[0246] La filogenia de las secuencias de proteína ClfA se examinó y se construyó un árbol filogenético. Se alinearon las secuencias usando ClustalW. Véase Chenna R, Sugawara H, Koike T, y col. Nucleic Acids Research. 31(13):3497 a 3500 (2003). Árboles se muestrearon con reemplazamiento 1.000 veces y demostraron con MEGA 4.0. Véase Tamura K, y col., Molecular Biology & Evolution. 24(8):1596 a 1599 (2007). Los valores de muestreo con reemplazamiento, que se indican en las ramas, son el número de veces que la rama se reprodujo en 1.000 ensayos. Se considera que unos valores menos de 500 (un 50 % de reproducibilidad) están escasamente soportados.

[0247] El secuencias de ClfA formas un árbol con 2 ramas principales. Véase la figura 9. La separación de estos dos grupos está muy soportada en la filogenia. Una rama (parte superior) incluye 9 secuencias que están bastante relacionadas entre sí (de un 96 a un 99 % de identidad) pero que están menos relacionadas con el clfA_011 de secuencia de candidato, al que éstas son de un 91 a un 92 % idénticas. El segundo grupo, que incluye clfA_011, es más diverso y la filogenia en este grupo no está tan bien soportada. Estas secuencias de proteína varían de un 93 a un 99 % idénticas entre sí.

160

Ejemplo 6: Diversidad de Secuencia de Fragmentos de polipéptido N1, N2 y N3 de ClfB

[0248] En el presente ejemplo, se evaluó la heterogeneidad de secuencia de proteína de los fragmentos de polipéptido de ClfB N1, N2 y N3 a partir de 92 aislados causantes de enfermedad que se obtienen a partir de varias fuentes. Se secuenciaron genes de ClfB a partir de las cepas de S. aureus asociadas con múltiples estados patológicos. Véase la tabla 11. Información con respecto a cepas adicionales se obtuvo a partir de GenBank para generar secuencias adicionales.

[0249] El alineamiento de secuencia de proteínas de ClfB a partir de diferentes cepas que dan lugar a enfermedad de S. aureus se muestra en la figura 10A a 10E. Las secuencias de proteína se alinearon usando MUSCLE. Véase Edgar, R.C. Nucleic Acids Research 32 (5):1792 a 1797 (2004). Los alineamientos se mostraron usando SHOWALIGN. Véase Rice, P. y col., "EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite" Trends in Genetics, 16 (6): 276 a 277 (2000). Véase la figura 10A a 10E alineamiento de ClfB. Como con ClfA, muchas de las secuencias se repitieron múltiples veces sin variación. Por motivos de claridad, cada secuencia única se colocó en el alineamiento sólo una vez. Véase la figura 10A a 10E. Sólo se incluyeron secuencias ClfB únicas en el listado de secuencia. Por ejemplo, la secuencia de ClfB_006 se obtuvo a partir de múltiples cepas diferentes sin variación alguna. Esta secuencia se muestra en la primera fila del alineamiento en la figura 10A a 10E. El número de listado de secuencia para cualquier secuencia puede también obtenerse a partir de la tabla 11. Este alineamiento de secuencias únicas representativas del antígeno de ClfB

indica que los polimorfismos estaban distribuidos a lo largo de la totalidad de la región A (N1-N2-N3) de ClfB. De forma similar a ClfA, para cualquier secuencia única dada de proteína de ClfB, se descubrió más de una secuencia de nucleótidos que codifica la misma proteína. Sólo la secuencia de ADN de aparición más frecuente se incluyó en el listado de secuencia y en la tabla 11. Para ClfB, las siguientes secuencias se dan a conocer en el presente documento y no se encuentran en GenBank: ClfB_001, ClfB_004, ClfB_005, ClfB_010, ClfB_011, ClfB_013, ClfB_014, ClfB_015, ClfB_016, ClfB_017, ClfB_018, ClfB_019, ClfB_020, ClfB_021, ClfB_022, ClfB_023, y ClfB_024. El árbol filogenético se muestra en la figura 11.

Tabla 11: Listados de secuencia y Cepas de ClfB

Cepa a modo de Ejemplo	ADN-ClfB	SEQ ID n.º:	Proteína-ClfB	SEQ ID n.º:	% Identidad a Antígeno
PFESA0286	clfB_001-1	15	clfB_001	16	95
PFESA0159	clfB_002-1	17	clfB_002	18	95
RF122	clfB_003-1	19	clfB_003	20	94
PFESA0271	clfB_004-1	21	clfB_004	22	95
PFESA0081	clfB_005-1	23	clfB_005	24	95
PFESA0080	clfB_006-1	25	clfB_006	26	100
PFESA0270	clfB_007-1	27	clfB_007	28	99
PFESA0269	clfB_008-1	29	clfB_008	30	95
PFESA0145	clfB_009-1	31	clfB_009	32	94
PFESA0069	clfB_010-1	33	clfB_010	34	95
PFESA0002	clfB_011-1	35	clfB_011	36	96

Cepa a modo de Ejemplo	ADN-ClfB	SEQ ID n.º:	Proteína-ClfB	SEQ ID n.º:	% Identidad a Antígeno
PFESA0128	clfB_013-1	37	clfB_013	38	96
PFESA0129	clfB_014-1	39	clfB_014	40	95
PFESA0136	clfB_015-1	41	clfB_015	42	99
PFESA0139	clfB_016-1	43	clfB_016	44	99
PFESA0140	clfB_017-1	45	clfB_017	46	96
PFESA0141	clfB_018-1	47	clfB_018	48	94
PFESA0144	clfB_019-1	49	clfB_019	50	97
PFESA0150	clfB_020-1	51	clfB_020	52	96
PFESA0152	clfB_021-1	53	clfB_021	54	96
PFESA0156	clfB_022-1	55	clfB_022	56	96
PFESA0163	clfB_023-1	57	clfB_023	58	94
PFESA0211	clfB_024-1	59	clfB_024	60	99

Ejemplo 7: Diversidad de Secuencia De MntC Clones de S. aureus que dan lugar a enfermedad

[0250] En el presente ejemplo, se evaluó la heterogeneidad de secuencia de proteína de genes de MntC a partir de 104 aislados que dan lugar a enfermedad que se obtienen a partir de varias fuentes. Se secuenciaron genes de MntC a partir de las cepas de S. aureus asociadas con múltiples estados patológicos. Véase la tabla 12. Información con respecto a cepas adicionales se obtuvo a partir de GenBank para generar secuencias de cepas.

[0251] El alineamiento de secuencia de proteínas MntC a partir de diferentes cepas que dan lugar a enfermedad de S. aureus se muestra en la figura 12A y 12B. Las secuencias de proteína se alinearon usando MUSCLE. Véase Edgar, R.C. Nucleic Acids Research 32 (5):1792 a 1797 (2004). Los alineamientos se mostraron usando SHOWALIGN. Véase Rice, P. y col., "EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite" Trends in Genetics, 16 (6): 276 a 277 (2000). Véase la figura 12. Como con ClfA, muchos de las secuencias se repitieron múltiples veces sin variación. Por motivos de claridad, cada secuencia única se colocó en el alineamiento sólo una vez. Véase la figura 12. Sólo se incluyeron secuencias de MntC únicas en el listado de secuencia. Por ejemplo, la secuencia de MntC_001 se obtuvo a partir de diferentes cepas sin variación alguna. Véase la figura 12. Esta secuencia se muestra en la primera fila del alineamiento en la figura 12. El número de listado de secuencia para cualquier secuencia puede también obtenerse a partir de la tabla 12. Sólo la secuencia de ADN correspondiente más frecuente se incluyó en el listado de secuencia. Para MntC, las siguientes secuencias se dan a conocer en el presente documento y no se encuentran en GenBank: MntC_002, MntC_006, MntC_007, MntC_008, y MntC_009.

Tabla 12: Listados de secuencia y cepas de MntC

Cepa	ADN-MntC	SEQ ID n.º:	Proteína-MntC	SEQ ID n.º:	% Identidad a Antígeno
PFESA0129	MntC_001-1	1	MntC_001	2	99

182

Cepa	ADN-MntC	SEQ ID n.º:	Proteína-MntC	SEQ ID n.º:	% Identidad a Antígeno
PFESA0142	MntC_002-1	3	MntC_002	4	99
PFESA0139	MntC_003-1	5	MntC_003	6	99
PFESA0286	MntC_006-1	7	MntC_006	8	99
PFESA0136	MntC_007-1	9	MntC_007	10	99
PFESA0150	MntC_008-1	11	MntC_008	12	99
PFESA0153	MntC_009-1	13	MntC_009	14	99

Ejemplo 8: Expresión de superficie de ClfA, CP5, CP8 Y MntC En vivo Durante Infección

[0252] S. aureus es responsable de dar lugar a una serie de infecciones humanas. Por consiguiente, las bacterias han de adaptarse a diferentes nichos ambientales mediante expresión diferencial de factores de virulencia que se requieren para la infección. La expresión de antígenos diana se estudió en tres ensayos en vivo de roedores para evaluar su expresión durante la infección: un modelo de herida para medir expresión del antígeno en el sitio de infección primario, un modelo de bacteriemia que supervisa la expresión de antígeno en la sangre, y un modelo de cámara permanente que

supervisa la expresión de antígeno durante unas condiciones de nutriente/oxigeno limitados. Para todos estos modelos los roedores se expusieron a bacterias en el sitio de estudio. A continuación de la infección, se recolectaron bacterias en varios puntos de tiempo y expresión de antígeno (ClfA, CP5, CP8, MntC) se evaluó usando microscopía inmunofluorescente (herida y bacteriemia) o citometría de flujo (cámara).

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

Expresión en el modelo de herida

[0253] Los experimentos de infección de heridas consisten en 5 animales/grupo y hasta 5 grupos para un máximo de 25 animales/experimento. Ratones macho C57BL/6 de seis a ocho semanas (sem.) de edad se sometieron a cirugía para incrustar un bucle de sutura en una incisión del músculo de muslo. Esto proporciona un sustrato de cuerpo extraño para la unión bacteriana y reduce significativamente la dosis mínima infecciosa necearia para producir una infección estafilocócica en la herida. Se introdujeron cinco µl de o bien S. aureus o bien solución salina estéril en la incisión bajo la sutura de tejido profunda de seda 4-0. La piel se cerró con suturas de 4-0 de Prolene o adhesivo quirúrgico (por ejemplo, cianoacrilato). Los animales se sacrificaron en puntos de tiempo entre 30 min y 10 días tras la infección y se extirpó el músculo del muslo, se homogeneizó y se recontaron las bacterias. Se analizaron las bacterias a la vista de la de infección para determinar la expresión de antígeno mediante microscopía confocal inmunofluorescente (SI).

Expresión en el modelo de bacteriemia

163

[0254] Se inmunizaron grupos de 10 ratones CD-1 o Balb/C de cuatro semanas de edad con 1 µg de proteína o CP conjugado mediante inyección subcutánea en las semanas 0, 3 y 6. Se extrajo la sangre a los animales en las semanas 0 y 8 seguido por una exposición intraperitoneal a S. aureus que se hace crecer hasta la fase log tardía en TSB. Tres horas tras la exposición los animales se sacrificaron y se extrajo la sangre para microscopía confocal SI.

Expresión en el modelo de tubo de diálisis permanentes

[0255] Se hicieron crecer aislados de S. aureus durante la noche sobre placas de TSA a 37 °C. Las bacterias se rasparon de las placas y volvieron a suspenderse en PBS estéril y la DO600 se ajustó a 1, aproximadamente 10^9 unidades de formación de colonias (ufc) /ml. Las bacterias se diluyeron hasta una concentración de 10^3 ufc/ml y se inocularon en tubos de diálisis. Una alícuota de la suspensión se sembró en placa para determinar el número real de ufc. Se preparó un tubo de diálisis con 3,5 kDa de MWCO para implante mediante esterilización en etanol al 70 % durante 30 minutos seguido por un enjuague extenso en agua estéril y a continuación solución salina estéril. Una alícuota de 2 ml de la suspensión bacteriana se transfirió al tubo de diálisis, se cerró la bolsa con un nudo, y a continuación se enjuagó extensamente con solución salina estéril. Se anestesiaron ratas Sprague Dawley ratas macho (6 semanas de edad) y se realizó una incisión de 2 a 3 cm a lo largo de la línea central dorsal. Se crearon espacios en el sitio de incisión separando cuidadosamente la piel del tejido subyacente. El subo se implantó en los espacios y se cerró la piel usando grapas

quirúrgicas. Después de 24 h, se sacrifiaron las ratas, se retiró el tubo, y se recuperaron las bacterias para análisis citométrico de flujo.

Microscopía inmunofluorescente (SI)

[0256] La sangre de 5 ratones se agrupó en citrato de sodio helado, pH 7,0 (concentración final, 0,4 %). Las células eucarióticas se lisaron con NP-40 al 1 % (Pierce Biotechnology). Las bacterias se lavaron dos veces con PBS y se incubó durante la noche a 4 °C con suero inmunitario o preinmunitario de conejo (1:100) y se detectaron con anticuerpos de cabra anti-conejo conjugado con ALEXA488 (1:250, Invitrogen). Las bacterias marcadas se secaron sobre un portaobjetos de microscopio y se montó un cubreobjetos con medio Vectashield HardSet (Vector Laboratories, Inc.). Se obtuvieron imágenes con un microscopio confocal espectral Leica TCS SL (Leica Microsystems).

Análisis citométrico de flujo

[0257] Se hicieron crecer aislados de S. aureus tal como se describe en el procedimiento de modelo de tubo de diálisis de rata. Se bloquearon aproximadamente 10^7 células bacterianas en tampón de tinción (solución salina equilibrada de Hank con un 10 % de sueros de cabra) durante 1 hora en hielo. Las células bacterianas se centrifugaron durante 5 minutos a 10.000 rpm, se retiró el sobrenadante, y se incubaron las células con anticuerpo de ratón o anticuerpo de control de isotipo durante 30 minutos en hielo. Las células se lavaron a continuación y se tiñeron con IgG de cabra anti-ratón conjugado con FITC (Jackson ImmunoResearch) en hielo durante 30 minutos. Se lavaron las bacterias dos veces con tampón de tinción, se fijaron con 2 % paraformaldehído y se adquirieron datos y se analizaron

usando citómetro de flujo FACS Caliber y Cell quest software (Becton, Dickinson y Co.). Se recogieron un total de 30.000 acontecimientos para cada muestra.

Tabla 13a: Expresión de perfiles de antígeno en aislados de tipo 5 de CP de S. aureus.

Antígeno		CP						ClfA						MntC					
Tiempo [h]		T0	1	4	6	24	72	T0	1	4	6	24	72	T0	1	4	6	24	72
PFESA0266	bacteriemia	+	-	±	+	/	/	+	-	±	+	/	/	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	herida	+	-	-	-	±	+	+	-	±	+	+	+	-	±	±	±	±	±
PFESA0272	bacteriemia	+	+	+	+	/	/	+	-	+	+	/	/	-	-	-	-	/	/
	herida	+	-	-	-	+	!	+	-	±	±	±	!	-	-	-	±	!	!
PFESA0094	bacteriemia	+	-	±	+	/	/	+	-	±	!	/	/	-	-	-	-	/	/
	herida	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	±	±	±
PFESA0093	bacteriemia	+	-	±	+	/	/	+	-	±	+	/	/	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	herida	+	-	-	±	+	+	+	-	-	-	±	±	-	-	-	±	±	±
PFESA0028	bacteriemia	+	-	-	+	/	/	+	-	±	±	/	/	-	-	±	±	/	/
	herida	+	-	-	-	-	-	+	-	-	±	±	±	-	-	-	±	±	-
PFESA0029	bacteriemia	-	-	±	+	/	/	+	-	-	+	/	/	-	-	-	+	/	/
	herida	-	-	-	-	±	±	+	-	-	-	-	±	-	-	-	±	±	-

/ = Se realizaron experimentos de bacteriemia durante 6 horas ! = el animal murió durante el experimento NT = no sometido a prueba

Tabla 13b: Expresión de perfiles de antígeno en aislados de tipo 8 de CP de S. aureus.

Antígeno		**CP**						**ClfA**						**MntC**					
Tiempo (h)		T0	1	4	6	24	72	T0	1	4	6	24	72	T0	1	4	6	24	72
PFESA0003	Bacteriemia	+	±			/	/	+	-	±	+	/	/	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PFESA0286	Bacteriemia	+	-	-		/	/	+	-	-	+	/	/	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PFESA0005	Bacteriemia	+	-	±	±	/	/	+	+	+	+	/	/	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PFESA0002	Bacteriemia	+	-	-	-	/	/	+	±	-	-	/	/	-	±	±	+	/	/
PFESA0269	Bacteriemia	+	-	-	-	/	/	+	-	-	-	/	/	-	-	±	±	/	/
PFESA0268	Bacteriemia	+	+			/	/	+	+	-	-	/	/	-	±	-	+	/	/
PFESA0025	Bacteriemia	+	-	-	-	/	/	+	+	-	-	/	/	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PFESA0283	Bacteriemia	+	-	-	-	/	/	+	+	+	-	/	/	±	±	±	±	/	/
PFESA0027	Bacteriemia	+	-	-	±	/	/	+	-	±	±	/	/	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PFESA0001	Bacteriemia	+	-	-	-	/	/	+	-	-	-	/	/	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PFESA0095	Bacteriemia	+	-	-	±	/	/	+	-	-	+	/	/	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PFESA0271	Bacteriemia	+	-	-	-	/	/	+	+	-	-	/	/	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PFESA0271	Bacteriemia	+	-	±		/	/	+	-	±	±	/	/	NT	NT	NT	NT	NT	NT

/ = se realizaron experimentos de bacteriemia durante 6 horas. ! = el animal murió durante el experimento NT = no sometido a prueba

Tabla 13c. Expresión de antígeno S. aureus en el tubo de diálisis permanente.

Frecuencia de positive células (% de total)

165

PFESA0266 de S. aureus	**Time (horas)**	**0**	**3**	**6,0**	**9,0**	**13,0**	**18,0**	**30,0**
	ClfA	69,8	13,7	8,5	8,0	12,5	8,8	16,4
	CP5	28,0	1,9	1,8	6,1	7,1	5,2	9,6
	MntC	91,4	4,3	5,6	2,9	20,8	37,0	33,2
S. aureus PFESA0005	**Time (horas)**	**0**	**3**	**6,0**	**9,0**	**13,0**	**18,0**	**24,0**
	ClfA	98,6	63,9	69,7	24,3	36,1	98,6	99,0
	CP8	77,3	43,0	18,0	7,5	11,8	96,4	94,0
	MntC	5,9	7,7	12,5	2,6	2,9	9,3	9,9

Resultados

[0258] Se sometieron a prueba una combinación de diecinueve aislados de S. aureus para determinar la expresión de ClfA, CP5, CP8, o MntC sobre la superficie celular de S. aureus durante la infección (tabla 13a, 13b, y 13c). Estos aislados incluían cepas clínicamente relevantes recientes y eran diversos tal como se monitorizó mediante MLST. La expresión de antígeno dependía de la cepa, el punto de tiempo, y el modelo de infección. La variación en expresión de antígeno entre aislados en diferentes entornos *in vivo* (flujo sanguíneo frente a herida) apoya el uso de una composición inmunogénica de múltiples antígenos para inducir una amplia cobertura de aislados estafilocócicos en una variedad de diferentes infecciones. Los antígenos se expresaron en superficie dentro de las primeras 24 horas de infección y son por lo tanto componentes válidos para una composición

inmunogénica anti-estafilocócica. Los antígenos proteicos ClfA y MntC eran accesibles para la tinción en presencia de expresión de la cápsula indicando que la presencia de cápsula no enmascara las proteínas de los anticuerpos que se dirigen contra ellos.

[0259] La mayor parte de los aislados de tipo 8 sometidos a prueba no expresaban CP en la sangre hasta puntos de tiempo tardíos tras la exposición (> 4 horas) (véase la tabla 13a-c). Estos resultados muestran que en CP de S. aureus está diferencialmente regulado dependiendo del microentorno *in vivo*, es decir, el sitio de infección. Estos resultados pueden explicar lso resultados de eficacia inconsistentes notificados para conjugados de CP8 en modelos animales.

[0260] Los resultados de expresión *in vivo* sugieren que ninguna formulación inmunogénica de un solo antígeno proporcionará amplia cobertura frente a la mayoría de infecciones por S. aureus. Hay demasiada diversidad de fenotipos de expresión por cepas individuales dentro de microentornos *in vivo*. Por lo tanto, se requiere una composición inmunogénica que consiste en más de un antígeno para evitar enfermedad por S. aureus.

Ejemplo 9: Inmunogenicidad de formulaciones de múltiples antígenos con contenido en conjugados de ClfA, CP5- y CP8-CRM_{197}

[0261] En el presente ejemplo, se evaluaron la inmunogenicidad de combinaciones de ClfA, CP5-CRM_{197} y CP8-CRM_{197}.

A. Formulación de composición inmunogénica de dos antígenos (CP5-CRM_{197}/CP8-CRM_{197}) – efecto de la dosis sobre las respuestas de anticuerpos anti-capsulares en conejo

[0262] En el presente ejemplo, se evaluó el efecto de la dosis sobre la inmunogenicidad de la formulación inmunogénica de CP5-CRM_{197} y CP8-CRM_{197} combinado en conejos. Se inmunizaron los conejos en la semana 0, 3 y 6 con conjugado bivalente más 125 µg de AlPO4 administrado mediante inyección subcutánea. Las dosis evaluadas en este estudio estudio fueron 0,1 µg, 1 µg, o 10 µg de cada uno de CP5-CRM_{197} y CP8-CRM_{197} (dosis final de CP-CRM_{197} combinado de 0,2 µg, 2 µg, y 20 µg). La dosis del conjugado refleja el componente total de polisacárido del conjugado de polisacárido de proteína. Se extrajo la sangre de los conejos en la semana 0, 3, 6 y 8. Se realizó ELISA en sueros agrupados e individuales. Se determinaron los títulos de anticuerpo finalse como la inversa de la dilución a DO405 0,1. Se realizó un análisis estadístico sobre los títulos de la semana 8 individuales. Los resultados mostraron que los títulos de anticuerpo específico más altos CP5 y CP8 de 5 X 10^5 para CP5 y 1 X 10^6 para CP8 se indujeron mediante vacunación de conejos con formulación inmunogénica bivalente a 1 µg de dosis de CP de cada componente (datos no mostrados).

B. Formulación de tres antígenos (CP5-CRM_{197} + CP8-CRM_{197} + rClfA) – estudio del intervalo de dosis de rClfA con dosis fijas (1 µg) de cada conjugado en conejos

[0263] Se sometió a prueba el efecto de una combinación de conjugados de rClfA y CP5 y CP8 sobre la respuesta inmunitaria a cada componente. Se inmunizaron tres grupos con CP5-CRM_{197} + CP8-CRM_{197} de S. aureus bivalente (1 µg dosis de cada conjugado) combinado con T7-ClfA (N1N2N3) a tres dosis diferentes 1, 10 y 100 µg. El grupo de control se inmunizó con CP5 y CP8 no conjugado (50 µg de cada uno) combinado con 100 µg de T7-

ClfA (N1N2N3). Cada composición inmunogénica se formuló con 500 µg de adyuvante AlPO4. Las composiciones inmunogénicas se administraron mediante inyección subcutánea en el cuello. Se extrajo la sangre de los conejos en la semana 0, 6 y 8. ELISA se realizó sobre sueros agrupados e individuales y se determinaron los títulos de anticuerpo de punto final como la inversa de la dilución DO405 0,1.

[0264] Los resultados mostraron que el aumento de la cantidad de rClfA cuando se combinaba con conjugado bivalente no afectaba a las respuestas de anticuerpos capsulares. Los niveles de anticuerpos frente a ambos serotipos capsulares estaban en el mismo intervalo que en conejos inmunizados con conjugado bivalente solo (datos no mostrados). Los niveles de anticuerpos frente a CP5 y CP8 fueron 2,5 veces más bajos a dosis de 10 (103 K) y 100 µg (106 K) en comparación con 1 µg de dosis de rClfA (273 K). Se produjo un efecto de refuerzo tras la segunda y tercera inyección. La formulación inmongénica de polisacárido bivalente no conjugado (CP5 + CP8, 50 µg de cada uno) combinada con 100 µg de rClfA no indujo anticuerpos específicos de CP. La respuesta de anticuerpos específicos de rClfA no se vio muy afectada por la dosis, cuando los títulos estaban entre 1 X 10^5 y 1 X 10^6 tras tres dosis para dosis de 1, 10 y 100 µg (datos no mostrados). También los niveles de respuseta anti-ClfA logrados cuando se administra con polisacáridos CP5 y CP8 conjugados o no conjugados fueron similares.

Ejemplo 10: Formulación de tres antígenos - Inmunogenicidad en conejos con altos títulos de Ac frente a CP5, CP8 y ClfA antes de la inmunización.

(67

[0265] La composición inmunogénica estafilocócica va dirigida a poblaciones adultas que tienen anticuerpos preexistentes frente a componentes de superficie de S. aureus. Para estudiar el efecto de anticuerpos preexistentes frente a componentes de formulación inmunogénica sobre la respuseta frente a la formulación inmunogénica, se seleccionaron conejos con altos títulos de anticuerpos anti-CP5, anti-CP8, y anti-ClfA que se adquieren de manera natural. Dos grupos de conejos (n = 6/7) se inmunizaron en la semana 0, 3 y 6 con formulación inmunogénica de tres anticuerpos (CP5-CRM_{197} (1 µg) y CP8-CRM_{197} (1 µg) y T7-ClfA (N1N2N3)Y338A (10 µg)). Un grupo se inmunizó con la composición inmunogénica que se formula con 500 µg de AlPO4 como adyuvante y el segundo grupo se inmunizó con formulación de composición inmunogénica sin contenido en adyuvante. Las composiciones inmunogénicas se administraron mediante inyección subcutánea. Se extrajo la sangre de los conejos en la sem. 0, 3, 6 y 8. Los títulos de anticuerpo frente a CP5, CP8 y rClfA se determinaron mediante ELISA como títulos de anticuerpos de punto final en suerpos agrupados e individuales (determinado como la inversa de la dilución a DO405 0,1).

[0266] Los resultados mostraron que los conejos títulos de anticuerpos preexistentes que se inducen mediante infección natural respondían a una formulación inmunogénica trivalente con un aumento en los niveles de anticuerpos frenet a todos los componentes de la formulación inmunogénica CP5, CP8 y rClfA. Un aumento de niveles de Ac fente a cada antígeno de entre 5 veces y 10 veces se mostró incluso en animales con títulos de anticuerpo de $1x10^6$. La presencia del adyuvante en la formulación

inmunogénica dio como resultado títulos de anticuerpo más altos en comparación con el grupo inmunizado sin adyuvante (datos no mostrados).

Ejemplo 11: Efecto del adyuvante sobre las respuestas frente a componentes de polisacárido de cápsula

A. Efecto de dos dosis diferentes de AlPO4 sobre la respuesta frente a composición inmunogénica de conjugado CP5-CRM_{197}/CP8-CRM_{197} bivalente en conejos

[0267] Se estudió el efecto de la dosis del adyuvante AlPO4 sobre las respuestas frente a CP5 y CP8 en conejos. Se inmunizaron conejos en la semana 0, 3 y 6 con CP5-CRM_{197} + CP8-CRM_{197} de S. aureus bivalente (1 µg de dosis de cada conjugado). Un grupo (n = 5/grupo) se inmunizó con composición inmunogénica formlada con 125 µg y un segundo grupo con 500 µg de AlPO4 como adyuvante. Las composiciones inmunogénicas se administraron mediante inyección subcutánea en el cuello. Se extrajo la sangre de los conejos en la semana 0, 6 y 8 y los anticuerpos anti-capsulares se determinaron mediante ELISA como títulos de anticuerpo de punto final determinados como la inversa de la dilución a DO405 0,1. Los resultados indicaban que no había ninguna diferencia en respusetas de anticuepos espefícicos de CP8 en conejos inmunizados con o bien 125 µg o bien 500 µg de AlPO4. La formulación con 125 µg de adyuvante dio respusetas de anticuerpos frente a CP5 más altas. Asimismo, todos los conejos en el grupo de 125 µg respondieron con respuestas de anticuerpos frente a CP5 más altas, mientras que el grupo de 500 µg de adyuvante, hubo dos conejos con baja respuesta frenet a la formulación.

168

B. Efecto de AlPO4 sobre la inmunogenicidad de formulación de tres antígenos

[0268] Se inmunizaron conejos (NZW, n = 6/7 conejos por grupo) en la semana 0, 3 y 6 con formulación de tres antígenos compuesta por CP5-CRM_{197} (1 µg) y CP8-CRM_{197} (1 µg) y T7-ClfA (N1N2N3)Y338A (10 µg). Un grupo de conejos se inmunizó con formulación inmunogénica con 500 µg de AlPO4, un segundo grupo se formuló sin adyuvante, el tercer grupo se inmunizó en la semana 0 con formulación inmunogénica con 500 de µg AlPO4 y semanas 3 y 6 con formulación inmunogénica sin adyuvante. Se administraron formulaciones inmunogénicas mediante inyección subcutánea, se extrajo la sangre de los conejos en la semana 0, 3, 6 y 8 y se evaluaron los sueros mediante ELISA específico de antígeno. Los resultados mostraron que la presencia de adyuvante en la formulación inmunogénica no tenía un efecto sobre las respuestas anti-CP5 o anti-CP8 en conejos (datos no mostrados). Los títulos GMT de Ac frente a ambas cápsulas eran comparables. No obstante, se produjo un efecto del adyuvante sobre la respustas de anticuerpos específicos de ClfA que se muestra en grupos inmunizados con adyuvante presente en las tres vacunaciónes. La segunda y tercera inmunización de refuerzo con formulación inmunogénica que no contenía AlPO4 en los conejos estimulados con la formulación inmunogénica con contenido en adyuvante dio respuestas frente a ClfA más altas en comparación con el grupo sin adyuvante.

Ejemplos 12 a 29: Evaluación de ClfA de S. aureus, MntC, CP5-CRM_{197} y CP8-CRM_{197}:

[0269] Los resultados de la evaluación preclínica se describió anteriormente en los ejemplos 12 a 29 de los conjugados de CP5 y CP8, ClfA y MntC. Los ejemplos muestran la eficacia de estos antígenos en modelos animales preclínicos. Los ejemplos también muestran que los anticuerpos generados por los conjugados de CP, ClfA y MntC tienen actividad funcional en ensayos *in vitro*.

[0270] Se usaron dos químicas diferentes para conjugar CP con CRM_{197}, pero no se observó ninguna diferencia en cuanto a la eficacia para los conjugados preparados mediante los procedimientos diferentes. La O-acetilación de los polisacáridos capsulares mostró que afectaba a la generación de anticuerpos funcionales. La evaluación de una composición inmunogénica combinada que comprende CP5-CRM_{197}, CP8-CRM_{197} y ClfA no mostró ninguna interferencia en los niveles de anticuerpos específicos (Ac) frente a cada componente de la formulación inmunogénica.

Materiales y Procedimientos

ELISA

[0271] Se recubrieron placas de ELISA de microtitulación Maxisorp (Nalge Nunc International, Rochester, NY) 18 horas a 4 °C o durante 90 min a 37 °C con 1 µg/ml de antígeno ClfA en PBS pH 7,5. Las placas se lavaron cinco veces en PBST (1X PBS, 0,1 % de Polysorbate 20) y se bloquearon con leche desnatada al 1 % (p/v) en PBS, con un 0,05 % de Polysorbate 20 durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas se lavaron dos veces con PBST, y se diluyeron en serie (3 veces) y se añadieron anti-sueros de conejo de 0, 3, 6 y 8 semanas individuales a las placas y se incubó o bien durante la noche a 4 °C o bien 2 h a 37 °C. Las placas se lavaron dos veces, y se

detectaron los anticuerpos primarios unidos con IgG de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa del rábano (1:1.000 dilución) en PBST. Las placas se incubaron durante 1 h a 37 ºC a continuación se lavaron y se revelaron con disolución de sustrato de ABTS-peroxidasa, (KPL, Inc., Gaithersburg, MD), a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de una disolución de SDS al 1 % (v/v). Se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de placas automatizado (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA). Los títulos de anticuerpo se expresaron como el recíproco de la dilución en suero más alta con un valor de absorbancia de 0,1. Se usó la prueba de la t de Student usando software JMP (SAS Institute, Cary, NC) para determinar diferencias en títulos de anticuerpo entre los diferentes grupos. Se consideró que una probabilidad de menos de 0,05 indicaba una diferencia estadísticamente significativa.

Modelos murinos de septicemia

[0272] El modelo murino de septicemia imita una enfermedad transmitida por la sangre. Para la inmunización pasiva, se trataron grupos de 15 ratones Swiss-Webster por vía intraperitoneal (i.p.) con IgG. Veinticuatro horas más tarde se expusieron los ratones a S. aureus 659 a 018 a través de una única inyección intravenosa (i.v.) (0,1 ml) a través de la vena de la cola. Todos los animales se siguieron durante 14 a 15 días, punto en el cual se sacrificaron todos los ratones restantes.

[0273] Para inmunización activa, se inmunizaron ratones con un antígeno a 0, 2 y 4 semanas y se expusieron en la semana 6 por vía intravenosa a S. aureus.

Modelo de endocarditis de conejos de inmunización activa

[0274] Se inmunizaron conejos blancos adultos de Nueva Zelanda por vía intramuscular 4 veces con 25 µg de antígeno. Un día tras la cirugía, se exponen los animales por vía i.v. a un bolo de S. aureus y se determina el número de las unidades de formación de colonias (ufc) en el tejido del corazón 24 horas tras la exposición.

Bacteriemia murina

[0275] Se usó un modelo de bacteriemia de 3 horas para determinar el efecto de vacunación sobre los números de bacterias en la fase temprana durante una infección. Los ratones se inmunizaron en las semanas 0, 3, y 6 con un antígeno seguido por exposición i.p. a S. aureus en la semana 8. Se extrajo la sangre de los animales 3 horas más tarde y se sembraron en placa diluciones en serie de sangre para recontar las bacterias.

Modelo de pielonefritis murino

[0276] El modelo de pielonefritis murino imita la diseminación de S. aureus a partir de la bacteriemia. Se inmunizaron grupos de 10 ratones CD-1 hembra de cuatro semanas de edad a las 0, 3 y 6 semanas con antígeno. Los ratones se expusieron mediante inyección i.p. S. aureus. Cuarenta y ocho horas tras la exposición los ratones se sacrificaron y las bacterias se recontaron en el riñón y la sangre.

Modelo de endocarditis de rata

[0277] El modelo de endocarditis de rata imita a la endocarditis en el ser humano en la que la colonización tiene lugar después de que una infección transportada por la sangre conduce a una colonización de tejido de corazón dañado. Ratas Sprague-Dawley hembra de cinco semanas de edad (Charles River, Kingston, NY) se inmunizaron en las semanas 0, 2 y 4 con 1 µg de

conjugado de CP5-CRM_{197} formuado con 100 µg de AlPO4. Se extrajo la sangre de los animales antes de la vacunación en la semana 0 y al final de la semana 5. Setenta y dos horas más tarde, un catéter (tubo de PE-10) se colocó quirúgicamente a través de la arteria carótida en el ventrículo izquierdo del corazón. La colocación del catéter da como resultado la formación de una vegetación estéril a la que los estafilococos pueden unirse tras la infección. Para evitar infecciones que resultan del procedimiento quirúrgico, los animales se trataron con el antibiótico Baytril (5 mg/kg) en el momento de cirugía y 8 horas tras la cirugía. Cuarenta y ocho horas tras la cirugía, las ratas se expusieron a PFESA0266 (aproximadamente 4 x 10^8 ufc) o SA315 (aproximadamente 1 x 10^9 ufc) mediante inyección intraperitoneal. Cuarenta y ocho horas tras la exposición las ratas se sacrificaron y se extrajeron los corazones y riñones y se colocaron en 3 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS). A continuación se homogeneizaron los órganos con un homogeneizador de tejidos (Kinematica AG, Luzernerstrasse, Alemania) y se llevaron hasta 10 ml con PBS. Los homogeneizados se diluyeron a continuación en seire y se sembraron en placa para el recuento bacteriano.

Monitorización de anticuerpos funcionales usando ensayos de destrucción opsonofagocítica

[0278] Las células efectoras diferenciadas a partir de una línea celular (por ejemplo, HL60) o células polimorfonucleares (PMN) aisladas de sangre de donante humano usando una disolución LYMPHOLYTE®-poli (Cedarlane laboratories limited, Ontario, Canadá), de acuerdo con el protocolo del fabricante, pueden usarse para este ensayo. Las células efectoras volvieron

a suspenderse en tampón de ensayo (medio de Eagle modificado con contenido en un 1 % de albúmina de suero bovino) a una concentración de aproximadamente 2 X 10^7 células/ml y se colocaron en una incubadora a 37 °C hasta que estuvieron listas para su uso. Se hizo que la cepa de S. aureus PFESA0266 creciera durante la noche sobre unas placas de agar de soja tríptico. Las células bacterianas se rasparon, se lavaron dos veces y volvieron a suspenderse en tampón de ensayo con un contenido de un 5 % de glicerol a una DO 600 = 1, lo que es igual a una concentración de aproximadamente 5 X 10^8 ufc/ml. Unas alícuotas de un ml de la suspensión bacteriana se congelaron y se almacenaron a -40 °C hasta que estuvieron listas para su uso. La suspensión bacteriana congelada se descongeló y se ajustó a una concentración de 10^6 ufc/ml en tampón de ensayo y se colocó en hielo. El ensayo se realizó usando unas placas de polipropileno de 1 ml de 96 pocillos Deep-Well estériles. Unas diluciones en serie en dos veces de muestras de anticuerpo (50 µl) se prepararon, a lo que siguió la adición de 300 µl de tampón de ensayo a la mezcla de anticuerpos. Se añadieron bacterias (50 µl) a las placas y se colocaron en un agitador rotatorio a 4 °C durante 30 minutos. La etapa de opsonización fue seguida por la adición de 50 µl de complemento humano (un 1 % de la concentración final). Por último, se añadieron 50 µl de células efectoras (concentración 10^7 células/ml) a la placa y la suspensión se mezcló bien mediante pipeteo repetido. Una alícuota de 50 µl de la suspensión se diluyó 10 veces en serie en una disolución de saponina al 1 % estéril, mediante agitación con vórtex para minimizar la aglutinación bacteriana y se colocó sobre una placa de agar de soja tríptico por duplicado. La placa de ensayo se incubó a 37 °C durante 1

171

hora con un mezclado continuo usando un agitador de tipo bandeja giratoria. Al final de la incubación, una alícuota de 50 µl de suspensión se diluyó 10 veces en serie en una disolución de saponina al 1 % estéril, se mezcló mediante agitación con vórtex para minimizar la aglutinación bacteriana y se colocó sobre una placa de agar de soja tríptico por duplicado. El porcentaje de destrucción se calculó determinando la razón del número de ufc que sobrevivieron a 60 minutos en pocillos con bacterias, anticuerpos, complemento y células efectoras con respecto al número de ufc que sobrevivieron en tubos carentes de anticuerpos pero con contenido en bacterias, complemento y células efectoras. Los controles con contenido en bacterias, complemento, y sueros se incluyeron para ajustar cualquier reducción en ufc debida a la aglutinación.

Adsorción de complemento

[0279] El suero a partir de donantes humanos adsorbido frente a cepas de S. aureus PFESA0266, PFESA0286 y PFESA0270 puede usarse como una fuente de complemento en el ensayo. Se hizo que crecieran unas cepas de S. aureus durante la noche sobre placas de TSA a 37 °C. Las células se rasparon de la placa y volvieron a suspenderse en PBS estéril. Las células bacterianas se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C y el sedimento celular volvió a suspenderse en suero humano para su adsorción. El suero se incubó con bacterias en un Nutator a 4 °C durante 30 minutos. Las células se centrifugaron, el suero se transfirió a otro tubo con contenido en bacterias y la etapa de adsorción se repitió de nuevo durante 30 minutos. Por último, las células se centrifugaron y el suero se pasó a través de un

filtro de 0,2 micrómetros antes de que 0,5 ml de alícuotas se congelaran en nitrógeno líquido.

Procedimiento II - OPA usando células HL-60

[0280] Las células HL-60 se diferenciaron de acuerdo con S. Romero-Steiner, y col., Clin Diagn Lab Immunol 4 (4) (1997), págs. 415 a 422. Las células HL-60 recolectadas volvieron a suspenderse en tampón de ensayo (medio de Eagle modificado con contenido en un 1 % de albúmina de suero bovino) a aproximadamente 10^8 células/ml y se colocaron en una incubadora a 37 °C hasta que estuvieron listas para su uso. Se hizo que S. aureus creciera durante la noche sobre unas placas de agar de soja tríptico. Las células bacterianas se rasparon, se lavaron dos veces y volvieron a suspenderse en tampón de ensayo con un contenido de un 5 % de glicerol a una DO 600 = 1, lo que es igual a aproximadamente 5 X 10^8 ufc/ml. Unas alícuotas de un ml de la suspensión bacteriana se congelaron y se almacenaron a -40 °C hasta que estuvieron listas para su uso. La suspensión bacteriana congelada se descongeló y se ajustó a una concentración de 10^6 ufc/ml en tampón de ensayo y se colocó en hielo. El ensayo se realizó usando unas placas de polipropileno de 1 ml de 96 pocillos Deep-Well estériles. Se prepararon unas diluciones en serie en dos veces de muestras de anticuerpo monoclonal (25 µl), a lo que siguió la adición de 150 µl de tampón de ensayo a la suspensión de anticuerpos. Se añadieron bacterias (25 µl) a las placas y se colocaron en un agitador rotatorio a 4 °C durante 30 minutos seguido por la adición de 25 µl de complemento humano (un 1 % de la concentración final). Por último, 25 µl de células HL-60 (107 células/ml) se añadieron a la placa y la suspensión se mezcló bien mediante

pipeteo repetido. Una alícuota de 25 µl de la suspensión se diluyó 10 veces en serie en una disolución de saponina al 1 % estéril, se mezcló mediante agitación con vórtex para minimizar la aglutinación bacteriana y se colocó sobre una placa de agar de soja tríptico por duplicado. La placa de ensayo se incubó a 37 °C durante 1 hora con un mezclado continuo usando un agitador de tipo bandeja giratoria. Al final de la incubación, una alícuota de 25 µl de suspensión se diluyó 10 veces en serie en una disolución de saponina al 1 % estéril, se mezcló mediante agitación con vórtex y se colocó sobre una placa de agar de soja tríptico por duplicado. El porcentaje de destrucción se calculó determinando la razón del número de ufc que sobrevivieron a 60 minutos en pocillos con bacterias, anticuerpos, complemento y células HL-60 con respecto al número de ufc que sobrevivieron en tubos carentes de anticuerpos pero con contenido en bacterias, complemento y células HL-60. Los controles con contenido en bacterias, complemento y AcM se incluyeron para ajustar cualquier reducción en ufc debida a la aglutinación.

Ejemplo 12: Demostración de un efecto protector mediante ClfA en modelos animales *in vivo*

[0281] Para evaluar si los anticuerpos de conejo policlonales provocados frente a ClfA podían reducir los recuentos de colonias de S. aureus en un modelo murino de septicemia, se usó IgG de conejo anti-ClfA policlonal purificada a dos dosificacioines (0,8 mg y 1,6 mg) en un estudio de inmunización pasiva (figura 13). La exposición de cepa de S. aureus era un aislado clínico reciente, 659 a 018. Ambas dosificacioines de anticuerpo dieron como resultado una reducción significativa de los recuentos de

colonias bacterianas en el modelo murino de septicemia (p = 0,0134 para dosis de 1,8 mg y p = 0,0013 para dosis de 0,8 mg). Este experimento se ha repetido con aislados de S. aureus adicionales con resultados similares (datos no mostrados).

Ejemplo 13: La inmunización activa con colonización reducida de ClfA del corazón mediante S. Aureus

[0282] La inmunización activa de los conejos con ClfA dio como resultado la protección en el modelo de endocarditis de conejo. Se encontró una reducción 3-4 log en las ufc de S. aureus recuperadas de vegetaciones cardíacas para animales inmunizados con ClfA en comparación con los animales inmunizados con el control negativo (PBS o AlPO4) (figura 14).

Ejemplo 14: Efecto protector de MntC en modelos animales *in vivo*

[0283] La inmunización activa con MntC ha mostrado una protección consistente de ratones frente a puntos de tiempo tempranos tras la exposición de S. aureus. Los recuentos de bacterias en la sangre de ratones que recibieron exposición i.p. de S. aureus se redujeron significativamente en comparación con los controles inmunizados con PBS (figuras 15A y 15B). Cuatro de entre seis estudios individuales mostraron una reducción significativa en ufc/ml de sangre en animales inmunizados. La protección mediada por inmunización con MntC se mostró usando 2 cepas diferentes de exposición de S. aureus, PFESA0237 (figura 15A) y PFESA0266 (figura 15B).

Ejemplo 15: Los conjugados de CP5 en modelo de pielonefritis murino

[0284] Los conjugados de CP5 se evaluaron para determinar su capacidad para proteger a ratones en un modelo de inmunización activa de pielonefritis.

La figura 16 muestra los resultados de varios estudios. Los recuentos de bacterias en la sangre de ratones que recibieron exposición i.p. de S. aureus se redujeron significativamente en comparación con controles inmunizados con PBS (figura 16). Seis de entre seis estudios individuales mostraron una reducción significativa en ufc/ml de riñones en animales inmunizados. Los datos mostraron una reducción consistente de la colonización del riñón tras la inmunización activa con conjugado de CP5.

Ejemplo 16: Los conjugados de CP5 preparados mediante diferentes químicas de conjugación protegen a los ratones frente infecciones experimentales

[0285] Los estudios de inmunización activa en el modelo de pielonefritis murino se llevaron a cabo usando conjugado de CP5 preparado mediante química o bien de PDPH o bien de CDT. Los procedimientos para conjugar CP5 o CP8 con CRM_{197} se describieron anteriormente. Los resultados mostraron que ambos conjugados reducen significativamente la colonización en ratones en comparación con los animales inmunizados sham (tabla 14).

Tabla 14: Efecto de PDPH frente a la conjugación de CDT en el modelo de pielonefritis

Estudio Nº	Antígenos	Cepa/Dosis	logUFC/Riñón	Significació
Estudio 1	Solución salina + AlPO4	PFESA0266	5,53 ± 1,90	--
	1 µg de CP5-CRM_{197} (PDPH) + AlPO4	2 x 10^8	3,01 ± 1,83	p < 0,001
	1 µg de CP5-CRM_{197} (CDT) + AlPO4		1,67 ± 0,23	p < 0,0001
Estudio 2	Solución salina + AlPO4	PFESA0266	6,17 ± 1,76	--
	1 µg de CP5-CRM_{197} (PDPH) + AlPO4	2,7 x 10^8	3,06 ± 1,69	p < 0,0001
	1 µg de CP5-CRM_{197} (CDT) + AlPO4		1,87 ± 0,69	p < 0,0001

Ejemplo 17: El conjugado de CP5 proteje en un modelo de endocarditis de rata

[0286] Se llevaron a cabo cuatro estudios con conjugado de CP5-CRM_{197} PDPH y un conjugado no reladcionado (PP5-CRM_{197}) a 1 µg de dosis. Los conjugados de CP5 reducían significativamente la colonización tanto en el corazón como los riñones en 2 de 3 experimentos en los que la cepa de exposición de tipo 5 era PFESA0266 (tabla 15). En el tercer estudio, el título anti-CP5 medio geométrico (GMT) era el ma´s bajo de los tres experimentos, pero fue sólo ligeramente más bajo que el título en el experimento previo (51.000 frente a 67.000).

Tabla 15: La inmunización de CP5-CRM_{197} reduce las ufc en el modelo de endocarditis de rata

		logUFC Recuperadas		Significación		GMT
Composición inmunogénica	Exposición Cepa/Dosis	Corazón	Riñón	Corazón	Riñón	Título de CP
1 µg de CP5-CRM_{197}	PFESA0266	4,34± 1,78	3,92±1,73			103.000
1 µg de PP5-CRM_{197}	2,21 x 10^8 ufc	7,94± 0,78	6,77± 0,79	p < 0,001	p < 0,05	
1 µg de CP5-CRM_{197}	PFESA0266	4,43± 2,30	3,109± 2,33			51.000
Solución	6,5 x 10^7	5,63±	4,19±	No	No	

		logUFC Recuperadas		Significación		GMT
salina	ufc	2,48	2,05			
1 µg de CP5-CRM_{197}	PFESA0266	4,01± 2,49	3,90± 1,92			67.000
Solución salina	$4,0 \times 10^8$ ufc	7,52± 1,38	6,52± 1,17	p < 0,0002	p < 0,0002	
1 µg de CP5-CRM_{197}	SA315	8,17± 1,02	6,92± 1,20			186.000
Solución salina	1×10^9 ufc	8,25± 0,60	6,74± 0,95	No	No	

Ejemplo 18: Conjugados de CP5-CRM_{197} en un modelo de pielonefritis

[0287] Se realizaron estudios iniciales que investigaban la eficacia de los conjugados con CP5 de 25 kDa de MW. Las mejoras en el procedimiento de fermentación dieron como resultado la producción del polisacárido de alto MW, que se conjugó con portador de proteína y se sometió a prueba junto con conjugado de CP5 de 25 kDa CP5. Los conjugados que comprenden CP con MW de 25 kDa (bajo MW) y 300 kDa (alto MW) se prepararon usando química de conjugación de CDT y se evaluaron en el modelo de pielonefritis murino. Tres dosis (0,01, 0,1 y 1 µg) de los conjugados de HMW se sometieron a prueba y se compararon con el CP5-CRM_{197} de LMW control y un conjugado no relacionado (PP5-CRM_{197}) a 1 µg de dosis. Los resultados

mostraron una reducción significativa en las UFC de PFESA0266 de S. aureus recuperadas de los riñones a un 1 µg de dosis. No hubo ninguna diferencia estadística entre la protección frente a conjugados preparados con CP5 de diferente tamaño a la dosis de 1 µg (tabla 16). La más baja (0,01 µg y 0,1 µg) del conjugado no provocó una respuesta inmunitaria suficiente para reducir significativamente la infección. El experimento se repitió usando un procedimiento de inmunización y de exposición idéntico. En el experimento repetido, sólo la dosis de 1 µg de CP5-CRM_{197} de LMW dio como resultado una reducción significativa en la colonización (p = 0,01). La dosis de 1 µg de CP5-CRM_{197} de HMW redujo las ufc en riñones, no obstante la reducción no fue estadísticamente significativa (p = 0,056).

Tabla 16. Los conjugados de CP5 protegen en un modelo de pielonefritis de ratón.

Estudio	Antígeno	Cepa/Dosis	logUFC/Riñón	Significación
1	1 µg de PP5-CRM_{197}	PFESA0266 $1,7 \times 10^8$	5.34	0.0048
	1µg de CP5 de 25		2.94	
	1 µg de CP5 de 300		2.74	0.0056
	0.1 µg de CP5 de 300		5.59	
	0.01 µg de CP5 de		4.70	
2	1 µg de PP5-CRM_{197}	PFESA0266 $1,7 \times 10^8$	5.35	
	1µg de CP5 de 25		3.25	0.01
	1 µg de CP5 de 300		3.78	0.06
	0.1 µg de CP5 de 300		4.45	
	0.01 µg de CP5 de		6.08	

Ejemplo 19: La O-acetilación de polisacárido es importante para la inducción de una respuesta de anticuerpos protectores frente a formulación inmunogénica de conjugado de CP5

[0288] Para evaluar la importancia de la O-acetilación de CP5, se O-desaceitló el CP5 nativo (dOAc) y se conjugó con CRM_{197} (dOAc-CRM_{197}) usando química de conjugación de PDPH. La eficacia del conjugado de dOAcCP-CRM_{197} se comparó junto con CP5-CRM_{197} en un modelo de pielonefritis murino. Los resultados mostraron que el conjugado que carece de grupos O-acetilo (dOAc CP5-CRM_{197}) no es eficaz en este modelo tal como se muestra mediante ningún cambio significativo en la colonización bacteriana en los riñones. Estos datos (tabla 17) indican que la O-acetilación era importante para la obtención de anticuerpos funcionales frente a CP5.

Tabla 17: La inmunización con CP5-CRM_{197} O-desacetilado no protege a los ratones frente a la colonización del riñón

Estudio Nº	Antígenos	Cepa/Dosis	logUFC/Riñón	Significación
Estudio 1	1 µg de PP5- CRM_{197}	PFESA0266	3,89 ± 2,24	
	1 µg de dOAc CP5-CRM_{197}	7×10^8	4,20 ± 1,75	
	1 µg de de CP5-CRM_{197}		1,75 ± 0,39	valor de $p < 0,008$
Estudio 2	Solución salina	PFESA0266	5,08 ± 1,96	
	1 µg de dOAc CP5-CRM_{197}	$2,4 \times 10^8$	5,89 ± 1,29	
	1 µg de CP5-CRM_{197}		2,93 ± 2,11	valor de $p < 0,02$

Ejemplo 20: La inmunización con conjugado de CP8 reduce la muerte en un modelo de septicemia

[0289] La eficacia de conjugado de CP8-CRM_{197} se evaluó en el modelo murino de septicemia después de una exposición a S. aureus PFESA0268 (tipo 8). Se inmunizaron de forma activa ratones Swiss Webster (n = 30) mediante inyección subcutánea con 1 µg de CP8-CRM_{197} y solución salina ambos formulados con 100 µg de AlPO4. El estudio mostró una reducción significativa de septicemia (p = 0,0308) en comparación con ratones inmunizados con AlPO4 solo. Véase la figura 17.

Ejemplo 21: Evaluación del CP8 tratado con base y nativo conjugado en el modelo de bacteriemia murino

[0290] La importancia de los grupos O-acetilo presesntes en el CP8 nativo antes de la conjugación para la inducción de respuestas de anticuerpos funcionales se evaluó para el cojugado de CP8. El polisacárido de CP8 se O-desacetiló en condiciones básicas suaves y tanto RMN como cromatografía ioónica (CI) confirmaron la ausencia de O-acetilación en CP8 des-O-Ac- CRM_{197}.

[0291] El modelo de bacteriemia murino se usó para evaluar la eficacia de CP8 nativo frente al tratado con base conjugado con CRM_{197}. Se inmunizaron grupos de ratones BALB/c hembra (15/grupo) en las semanas 0, 3 y 6, con 1 µg de CP8 des-O-Ac - CRM_{197} o 1 µg de CP8 O-Ac - CRM_{197}. Se formularon formulaciones inmunogénicas con 22 µg de AlPO4. Los animales se expusieron a S. aureus PFESA0003. Tres horas después de la exposición los ratones se sacrificaron y las bacterias se recontaron en la sangre. Los datos mostraron que había una reducción estadísticamente significativa (p = 0,0362) en las ufc bacterianas recuperadas de la sangre de animales inmunizados con conjugado de CP8 nativo sin tratar tal como se

determina mediante la prueba de la t de Student (tabla 18). En animales que se inmunizaron con conjugado de CP8 tratado con base las ufc bacterianas recuperadas de la sangre fueron similares al grupo de control con solución salina.

Tabla 18: El conjugado de CP8-CRM_{197} reduce la bacteriemia de S. aureus PFESA0003 en ratones.

Antígeno	Cepa/Dosis	logUFC/Sangre	Significación (valor de p)
Solución salina	PFESA0003 $1,14 \times 10^8$	4,35	
CP8 des-O-Ac - CRM_{197}		4,45	
CP8 O-Ac - CRM_{197}		3,93	0,03

Ejemplo 22: Confirmación de la importancia de la O-acetilación como epítopo funcional de CP5 mediante OPA usando AcM con especificidades conocidas

[0292] Se evaluaron anticuerpos monoclonales frente a CP5 con especificidades para CP5 OAc + (CP5-7-1), CP5 OAc + /- (CP5-5-1) y CP5 OAc- (CP5-6-1) para determinar la actividad de destrucción de OP frente a la cepa de tipo 5 PFESA0266 (tabla 19). AcM CP8-3-1 específico frente a CP8 OAc + se usó como control negativo. Los resultados mostraron que el AcM CP5-7-1 (CP5 OAc + específico) media la destrucción de ambas cepas de tipo 5 sometidas a prueba. También el AcM CP5-5-1 que reconocían epítopos compartidos tanto por CP5 OAc + como CP5 OAc- mediaban la destrucción de la cepa PFESA0266. El AcM específico para epítopos

presentes en el polisacárido CP5 OAc- no mediaba la destrucción de la cepa PFESA0266. Estos resultados indican que los epítopos de O-acetilo en CP5 están implicados en la actividad funcional de anticuerpos específicos de CP5.

Tabla 19 AcM específicos frente a CP5 O-acetilado (+) y CP5 O- y des-O-Acetilado (+ /-) son opsónicos frente a PFESA0266 de S. aureus (tipo 5).

	CP5-5-1 (O-Ac + /-) (µg)				CP5-6-1 (O-Ac -) (µg)				CP5-7-1 (O-Ac +) (µg)				CP8-3-1 (control neg.) (µg)			
µg	20	10	5	2,5	20	10	5	2,5	20	10	5	2,5	20	10	5	2,5
% de destrucción	28	33	30	21	-12	-5	-12	-5	31	46	49	55	-18	-3	-13	-5

Los datos se notificaron como porcentaje de destrucción y se calcularon determinando la razón del número de ufc que sobrevivieron a 60 minutos en pocillos con bacterias, anticuerpos, complemento y células HL-60 con respecto al número de ufc que sobrevivieron en pocillos carentes de anticuerpos pero con contenido en bacterias, complemento y células HL-60.

Ejemplo 23: Actividad opsónica de anticuerpos ratón que se inducen frente a conjugados de CP5 de alto y bajo MW

[0293] Sueros de ratones (n = 5) con altos títulos de CP5 en ELISA de grupos de 1 µg de alto peso molecular y bajo peso molecular del ejemplo 18 se compararon para determinar la actividad opsónica usando PFESA0266 de S. aureus. Los resultados de OPA mostraron que ambos conjugados

generaban anticuerpos opsónicos en ratones (tabla 20). Había una tendencia observada de los conjugados de alto MW a provocar anticuerpos opsónicos de títulos más altos. Datos mostrados como un % medio de destrucción ± SEM para 5 sueros de ratón individuales. Los anticuerpos necesitan ser funcionales tal como se mide por la destrucción de bacterias o bien en un modelo de eficacia animal o bien a través de un ensayo de destrucción opsonofagocítica que muestra que los anticuerpos destruyen las bacterias. Puede que la destrucción funcional no se demuestre usando un ensayo que sólo supervisa la generación de anticuerpos únicamente, lo que no es indicativo de la importancia de conjugados de alto peso molecular en cuanto a la eficacia.

Tabla 20: Los conjugados de CP5 tanto de LMW como HMW provocan anticuerpos opsónicos

Antígeno: 1 µg de CP5-CRM_{197} (25 kDa)		Antígeno: 1 µg de CP5-CRM_{197} (300 kDa)	
título de OPA sem 0	título de OPA sem 8	título de OPA sem 0	título de OPA sem 8
< 100	400	< 100	6.400
< 100	< 100	< 100	800
< 100	400	< 100	3.200
< 100	3.200	< 100	3.200
< 100	< 100	< 100	3.200

Ejemplo 24: Actividad opsónica de sueros de ratones inmunizados con conjugados de CP8 nativos y modificados químicamente

[0294] Se compararon sueros de ratón seleccionados (n = 5) con altos títulos de CP8 del el estudio en el ejemplo 21 para determinar la actividad opsónica usando la cepa PFESA0005. Los resultados de OPA (tabla 21) muestran que sólo los conjugados preparados mediante la conjugación de CP8 nativo generaban anticuerpos opsónicos nativos en ratones. Es digno de mención que el conjugado de CP8 des-OAc era inmunogénico en ratones pero los anticuerpos generados no eran opsónicos en este ensayo. Los títulos de OPA se notifican como la inversa de la dilución a la que se observó el 40 % de destrucción. Los anticuerpos necesitan ser funcionales tal como se mide por la destrucción de bacterias o bien en un modelo de eficacia animal o bien a través de ensayo de destrucción opsonofagocítica que muestra que los anticuerpos destruyen las bacterias. Puede que la destrucción funcional no se demuestre usando un ensayo que sólo monitoriza la generación de anticuerpos únicamente, lo que no es indicativo de la importancia de la O-acetilación en cuanto a la eficacia.

Tabla 21. Actividad opsónica de CP8 nativo frente a CP8-CRM_{197} des-O-Ac

Ejemplo 25: La destrucción de cepas de tipo 8 mediante antisueros de primate no humano de conjugado de CP8 se inhibe mediante la adición de CP8 nativo

178

[0295] Para confirmar la especificidad de la actividad de destrucción en los sueros de primates no humanos inmunizados con conjugado de CP8, se realizó un ensayo en presencia de CP8 nativo. El procedimiento de OP II se usó con las siguientes modificaciones. Unas diluciones en serie en dos veces de muestras de anticuerpo (25 µl) se prepararon, a lo que siguió la adición de o bien 150 µl (competidor Pn14) o bien 125 µl (competidor CP8) de tampón de ensayo a la suspensión de anticuerpos. El competidor era el polisacárido de CP8 purificado (CP8 poli) y polisacárido neumocócico no relacionado (Pn 14 poli) se usó como control. Los polisacáridos se añadieron (50 µg) a la suspensión de anticuerpos y la placa se incubó a 4 °C durante 30 minutos con mezclado de extremo sobre extremo. Tras la incubación con polisacáridos, se añadieron bacterias (25 µl) a las placas y se colocaron en un agitador rotatorio a 4 °C durante 30 minutos seguido por la adición de 25 µl de complemento humano (un 1 % de la concentración final). Los resultados (tabla 22) mostraron que la presencia de CP8 nativo en la mezcla de reacción inhibía la destrucción opsonofagocítica de S. aureus tipo 8. Estos resultados confirman que destrucción opsonofagocítica mediante sueros inmunitarios estaba mediada mediante Ac específicos de cápsula.

Tabla 22. La adición de polisacárido de CP8 inhibe la destrucción opsonofagocítica se S. aureus mediante sueros inmunitarios.

Mono	Muestra de sueros	Título de OPA
02D133	Sem 0	< 50
	Sem. 8	4.050
	Sem 0 + 20 µg de CP8 poli	< 50

Mono	Muestra de sueros	Título de OPA
	Sem 8 + 20 µg d eCP8 poli	< 50
	Sem 0 + 20 µg de Pn14 poli	< 50
	Sem. 8 + 20 µg de Pn 14 poli	4.050
A4N122	Sem. 0	< 50
	Sem. 8	4.050
	Sem 0 + 20 µg de CP8 poli	< 50
	Sem 8 + 20 µg de CP8 poli	< 50
	Sem 0 + 20 µg de Pn14 poli	< 50
	Sem 8 + 20 µg e Pn 14 poli	1.350

Ejemplo 26: Los anticuerpos adquiridos de manera natural frente a ClfA median la destrucción opsonofagocítica de S. Aureus

[0296] Los seres humanos en la población están naturalmente expuestos S. aureus y por lo tanto tienen anticuerpos preexistentes frente a esa bacteria en su circulación. Se usaron anticuerpos anti-ClfA purificados de humano y se evaluó si los anticuerpos podrían mediar la destrucción opsónica. Se ha demostrado que los anticuerpos frente a ClfA son opsónicos para el

polisacárido capsular de S. aureus (datos no mostrados). Se hizo que la cepa PFESA0266 creciera durante la noche en caldo de Columbia con NaCl al 2 %. Las bacterias se opsonizaron con IgG de ser humano purificada por afinidad frente a ClfA o IgG de ser humano purificado por afinidad frente a antígeno irrelevante (control negativo, proteína de SCP estreptocócica) y se sometió a prueba la actividad opsónica. Se usaron células HL-60 diferenciadas en el ensayo opsonofagocítico a una razón de efector/diana de 100:1. Como control adicional, se incluyó un AcM frente a CP5 en el experimento para mostrar la presencia de CP5 en la superficie. Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes. Los anticuerpos específicos frente a ClfA y CP5 mediaron la destrucción opsónica y los anticuerpos específicos de SCP (control negativo) no tenían ninguna actividad en este ensayo.

Ejemplo 27: El conjugado de CP5-CRM$_{197}$ genera anticuerpos opsónicos en primates no humanos (NHP)

[0297] Para comparar la funcionalidad de conjugados de CP5-CRM$_{197}$ de alto frente a bajo peso molecular en NHP, se inmunizaron grupos de cinco monos con dosis de 2 y 20 µg de los conjugados con o sin AlPO4 adyuvante. Los monos recibieron la primera y segunda vacunación en el día 0 y 28, respectivamente. Las extracciones de sangre del día 0, 14, 28 y 42 se sometieron a prueba para determinar la actividad de OP. Los resultados se resumen en la tabla 23. El conjugado de HMW de 20 µg tenía los títulos de OP más altos en comparación con otros grupos. Asimismo, la frecuencia de monos positivos para OP era más alta a ambas dosis de los grupos de alto MW que para los grupos de bajo MW correspondientes. Estos

resultados muestran que existe una tendencia del conjugado de CP5-CRM_{197} de HMW a provocar mejores respuestas de OP que el conjugado de CP5 de LMW en NHP.

Tabla 23. OPA de suero de NHP tras la inmunización con conjugados de CP5.

		Título de OPA (40 % de destrucción)			
Grupo	Mono ID	Día 0	Día 14	Día 28	Día 42
20 µg de CP5 (HMW) + AlPO4 0,5 mg/ml	A2N053 149N A4L069 A1N097 A4L014	450 100 100 100 100	1.350 4.050 450 4.050 < 100	4.050 4.050 150 1.350 < 100	4.050 4.050 < 100 1.350 < 100
2 µg de CP5 (HMW) + AlPO4 0,5 mg/ml	02D125 A4L081 A2N055 A4N084 A1N085	100 100 150 100 100	150 150 450 < 100 150	150 150 150 < 100 450	< 100 150 150 < 100 4.050

			Título de OPA (40 % de destrucción)		
Grupo	Mono ID	Día 0	Día 14	Día 28	Día 42
		100			
2 µg de CP5 (HMW) sin AlPO4	A4L084 97N004 A4L055 97N123 225N	150 150 < 100 < 100 < 100	150 450 < 100 < 100 < 100	< 100 450 < 100 150 < 100	< 100 450 < 100 150 < 100
20 µg de CP5 (LMW) + AlPO4 0,5 mg/ml	02D017 A4N100 257N A4L046 A1N098	< 100 < 100 < 100 < 100 < 100	< 100 150 < 100 < 100 150	< 100 150 < 100 < 100 < 100	< 100 4.050 < 100 < 100 < 100
2 µg de CP5 (LMW) +	96N022 02D005 02D113	150 < 100	150 1.350 150	450 450 150	150 1.350 < 100

			Título de OPA (40 % de destrucción)		
Grupo	Mono ID	Día 0	Día 14	Día 28	Día 42
AlPO4 0,5 mg/ml	A2N040	< 100	150	< 100	< 100
	A4L056	150	150	< 100	< 100
		150			

Ejemplo 28: Los conjugados de polisacárido de cápsula que comprenden polisacáridos de alto peso molecular muestran una inmunogenicidad aumentada en comparación con los conjugados que comprenden polisacáridos de bajo peso molecular.

[0298] Se llevaron a cabo estudios en primatos no humanos (NHP) para evaluar la inmunogenicidad de diferentes formulaciones de conjugado de cápsula. Se sometieron a prueba dos formulaciones a dos niveles de dosificación diferentes (2 y 20 µg). La primear formulación estaba compuesta por un polisacárido de alto peso molecular (HMW) (aproximadamente 130 kDa) conjugado con CRM_{197}. La segunda formulación contenía un polisacárido de bajo peso molecular (LMW) (aproximadamente 25 kDa) conjugado con CRM_{197}. Se vacunaron grupos de cinco primates con una dosis individual de una u otra vacuna y se monitorizaron los títulos inmunitarios antes de la vacunación y dos semanas tras la vacunación. Los títulos de OPA se definieron como la dilución de suero requerida para destruir el 40 % de cepa de S. aureus PFESA0266 en un ensayo de OPA. Los títulos de anticuerpo también se monitorizaron mediante ELISA. Se

observó una actividad aumentada para la vacuna de HMW en comparación con la formulación de LMW (tabla 24), que se demuestra por un aumento de diez veces en los títulos de anticuerpo para la vacuna de HMW vacuna en comparación con la vacuna de LMW. La tasa de sujetos que responden a OPA para los NHP que recibieron la vacuna de HMW también fue más alta (un 80 % en comparación con un 40 %).

Tabla 24. Se observa inmunogenicidad aumentada para vacunas de conjugado de polisacárido de HMW en comparación con vacuna de conjugado de polisacárido de LMW.

	CP5-CRM_{197} dosis nivel (mcg) por animal	**Media geométrica de PD1***	**Tasa de sujetos que responden a OPA (%)±**
HMW (125 kDa)	20	32	80
	2	21	80
LMW (25 kDa)	20	3	40
	2	8	40

* Aumento en veces calculado a partir de título de ELISA de CP5 2 semanas tras la vacunación en comparación con títulos antes de la vacuna. ± Tasa de sujetos que responden calculada a partir de monos que generan un aumento en el título de OPA tras una dosis individual de vacuna 2 semanas tras la vacunación. Cada grupo contenía 5 macacos Rhesus y las vacunas se formularon con AlPO4 (250 mcg/dosis)

Ejemplo 29: Formulación de dos antígenos (CP5-CRM_{197} y ClfA) - Respuestas en primates no humanos

[0299] Para evaluar la respuesta inmunitaria a una dosis individual de composiciones inmunogénicas de dos antígenos (CP5-CRM_{197} y ClfA) en NHP, se inmunizaron grupos de cinco monos con diferentes dosis de los dos antígenos sin la adición de AlPO4. Las extracciones de sangre del día 0, 14, y 28 se sometieron a prueba para determinar la actividad opsnofagocítica (OP) y los títulos de ELISA y los resultados se resumen en la tabla 24. Los resultados mostraron que la actividad de OP se observaba constantemente en animales inmunizados con CP5 en comparación con un grupo sham CP5. En conjunto, el grupo de 100 µg tenía los títulos de ELISA y OP más altos en comparación con otros grupos. No hubo ninguna actividad de destrucción de OP obsersvada con sueros del grupo de ClfA solo. No se observó ninguna interferencia en los grupos a los que se les administraron dosis crecientes de ClfA o CP5. Véase la tabla 25.

Tabla 25: Resultados de OPA del estudio de inmunización bivalente en NHP

		Título de OPA (40 % de destrucción)		
Grupo Nº	ID Número	Semana: 0	Semana: 2	Semana: 4
180 µg de ClfA + 20 µg de 130 kDa CP5	A4R054	< 100	150	< 100
	A4R056	< 100	150	150
	A4N087	< 100	450	450
	97N152	< 100	450	1.350
	A4R027	< 100	1.350	1.350
180 µg de ClfA + 2 µg de 130 kDa CP5	A4R062	< 100	150	< 100
	97N149	< 100	150	< 100
	A4R131	< 100	450	150
	97N025	< 100	450	450

182

		Título de OPA (40 % de destrucción)		
Grupo Nº	ID Número	Semana: 0	Semana: 2	Semana: 4
	A4N064	< 100	450	450
60 µg de ClfA + 20 µg de 130 kDa CP5	A4L005	< 100	< 100	< 100
	A4R029	< 100	1.350	1.350
	A3N015	< 100	< 100	< 100
	98N021	150	4.050	4.050
	A4R137	< 100	< 100	< 100
60 µg de ClfA + 2 µg 130 de kDa CP5	A1N040	< 100	150	150
	A2N104	< 100	1.350	< 100
	A4L033	< 100	150	< 100
	96N048	< 100	< 100	< 100
	A4R032	< 100	< 100	< 100
2 µg de 130 kDa CP5	A4R135	< 100	450	150
	A1N118	< 100	150	150
	A4R061	< 100	< 100	1.350
	A4R101	< 100	4.050	1.350
	97N137	< 100	1.350	1.350
20 µg de 130 kDa CP5	A4R135	< 100	< 100	< 100
	A4N115	< 100	150	150
	95N038	< 100	< 100	< 100
	A4N120	< 100	450	450
	96N004	< 100	150	150
100 µg de 130 kDa	A4N116	< 100	450	450
	A3N097	< 100	450	450

		Título de OPA (40 % de destrucción)		
Grupo Nº	ID Número	Semana: 0	Semana: 2	Semana: 4
CP5	A4N108	< 100	1.350	1.350
	98N034	< 100	450	150
	99N034	< 100	1.350	4.050
60 µg de ClfA	97N057	< 100	< 100	< 100
	A4R112	150	< 100	150
	A4L022	< 100	< 100	< 100
	97N100	< 100	< 100	< 100
	99N041	150	150	150

Los modelos animales muestran potencial de antígenos de polisacárido de cápsula de CP5 y CP8 de S. aureus

[0300] Tanto los conjugados de CP5-CRM_{197} como de CP8-CRM_{197} indujeron respuestas de anticuerpo específicas de serotipo capsular en ratones, ratas, conejos y primates no humanos (NHP). Los anticuerpos inducidos conjugados eran funcionales en el ensayo de destrucción de opsonofagocitosis funcional *in vitro*. Se generaron datos para mostrar que la O-Acetilación es importante para la obtención de anticuerpos de protección para tanto CP5 como CP8, y que los grupos O-acetilo son parte de un epítopo reconocido por OPA + AcM frente a CP5. Los AcM que reconocieron CP5 nativo que está O-acetilado son funcionales en OPA y median la destrucción de las bacterias. El conjugado de CP8 indujo anticuerpos funcionales tanto en ratones como en conejos que mediaron la destrucción de cepa de tipo 8 en OPA. La especificidad de destrucción por anticuerpos

183

policlonales o monoclonales se confirmó por la abolición de la destrucción después de la adición del polisacárido nativo homólogo con el ensayo. Los varios modelos de inmunización activa se usaron para mostrar la eficacia preclínica tanto de conjugados de CP5- y de CP8-CRM_{197}. El conjugado de CP5 mostró eficacia consistente en el modelo de pielonefritis murino y el modelo de endocarditis de rata. La importancia de la O-acetilación de CP5 se confirmó en el modelo de pielonefritis murino, en el que el CP5 des-O-acetilado conjugado con CRM_{197} no protegió a animales frente a infección experimental.

[0301] La combinación de los conjugados en una formulación de dos antígenos indujo anticuerpos en ambas cápsulas de CP5 y CP8 y no hubo interferencia con los niveles de anticuerpos específicos inducidos en comparación con inmunizaciones de único antígeno. La combinación de conjugados y ClfA en una formulación de tres antígenos indujo niveles de CP5, CP8 y ClfA alto, y no hubo interferencia con las respuestas de anticuerpo inducidas frente a cualquier antígeno presente en la combinación. Las composiciones inmunogénicas de tres antígenos indujeron respuestas de anticuerpo (Ac) capaces de ser reforzadas para todos los tres componentes en conejos con altos títulos preinmunitarios.

[0302] Estos resultados sugieren que CP5 y conjugado de CP8 con CRM_{197} deberían incluirse como componentes de formulación inmunogénica de una de composición inmunogénica de S. aureus de protección.

Ejemplo 30: Requisito de diferentes antígenos para proteger frente a múltiples enfermedades por S. aureus posibles

[0303] S. aureus da lugar a una amplia serie de infecciones variando de infecciones de la piel relativamente leves a infecciones más graves e invasivas tal como endocarditis, fascitis necrotizante, osteomielitis, artritis séptica y neumonía. Cada uno de estos sitios *in vivo* es único y las bacterias probablemente respondan a las diferencias en los estímulos ambientales alterando sus perfiles de expresión de antígeno a unos más adecuados para la cepa individual para colonizar, crecer y finalmente dar lugar a enfermedad. Tal como se ejemplifica en el ejemplo 12, cepas de S. aureus muestran diversidad de expresión de antígeno *in vivo*. Es más probable que una composición inmunogénica multicomponente que está compuesta por antígenos diferentes proteja frente a la diversa manifestación de enfermedad causada por S. aureus.

[0304] Se mostró ClfA que protegió en una endocarditis y modelos de septicemia de roedor. Se ha informado de que ClfB es importante en la colonización nasal de S. aureus. MntC protegió a ratones en un modelo de bacteriemia murino. El conjugado de CP5 protegió en pielonefritis y endocarditis, y el conjugado de CP8 protegió en pielonefritis y modelos de septicemia de roedor. Estos resultados muestran que una vacuna multicomponente con contenido en estos antígenos protegerá frente a múltiples tipos de enfermedad por S. aureus.

[0305] Los modelos animales *in vivo* aproximan el curso de una infección real y ayudar a esclarecer qué antígenos pueden ser útiles en la protección frente a una enfermedad particular. La tabla 26 resume resultados a partir de numerosos experimentos realizados en varios modelos *in vivo*. Se informa de los resultados en cada bloque como cuatro números separados por una

184

barra, por ejemplo, ClfA en un modelo de septicemia tiene los números 27/1/3/31. El primer número representa el número de experimentos en los que la inmunización de ClfA produjo un resultado positivo estadísticamente significativa de protección. El segundo número representa el número de experimentos en los que la inmunización de ClfA produjo un resultado positivo de protección que tendió a ser significativo pero que no era estadísticamente significativo. El tercer número representa el número de experimentos en los que la inmunización de ClfA produjo un resultado negativo, pero no fue estadísticamente significativo. El cuarto número es el número total de experimentos realizados. Los primeros tres números deberían sumarse hasta ser iguales al cuarto número.

Tabla 26. Resumen de protección en modelos animales para antígenos de S. aureus

	ClfA	CP5	CP8	MntC20
Bacteriemia	1/4/0/5	3/0/3/6	1/1/1/3	6/2/5/13
Septicemia	27/1/3/31	1/0/0/1	NT	NT
Pielonefritis	0/4/2/6	13/1/0/14	NT	1/0/4/525
Endocarditis	3/6/1/10	3/2/2/7	NT	NT

NT: No sometido a prueba

Ejemplo 31: Realización de pruebas de varias composiciones inmunogénicas multiantígeno *in vitro* e *in vivo*

[0306] Varias formulaciones inmunogénicas estafilocócicas multiantígeno con contenido en o bien tres, cuatro o bien cinco antígenos que se seleccionan de los siguientes polipéptidos y/o polisacáridos se someten a prueba para inmunogenicidad y eficacia en varios modelos *in vivo*: ClfA, ClfB, MntC, CP5- y CP8. Las composiciones inmunogénicas son tal como sigue:

[0307] (1) una composición inmunogénica que comprende: un polipéptido de factor de aglutinación A (ClfA) de S. aureus aislado, un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 5 conjugado con CRM_{197}, y un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 8 conjugado con CRM_{197};

[0308] (2) Una segunda combinación proporciona factor de aglutinación A (ClfA), factor de aglutinación B (ClfB), una MntC aislada, polisacárido capsular de CP5 estafilocócico aislado conjugado con CRM_{197}, y polisacárido capsular de CP8 estafilocócico aislado conjugado con CRM_{197};

[0309] (3) Una tercera combinación proporciona una composición inmunogénica que comprende: un polipéptido de factor de aglutinación A (ClfA) de S. aureus aislado, un polipéptido de factor de aglutinación B (ClfB) de S. aureus aislado, o una proteína MntC de S. aureus aislada, un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 5 conjugado con CRM_{197}, y un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 8 conjugado con CRM_{197}; aislado

[0310] (4) Una cuarta combinación proporciona una composición inmunogénica que comprende: un polipéptido de factor de aglutinación B (ClfB) de S. aureus aislado, un polisacárido capsular de S. aureus aislado de

tipo 5 conjugado con CRM_{197}, y un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 8 conjugado con CRM_{197};

[0311] (5) Una quinta combinación proporciona una composición inmunogénica que comprende: un polipéptido de factor de aglutinación B (ClfB) de S. aureus aislado, una proteína MntC de S. aureus aislada, un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 5 conjugado con CRM_{197}, y un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 8 conjugado con CRM_{197}; y

[0312] (6) Una sexta combinación proporciona una composición inmunogénica que comprende: un polipéptido de factor de aglutinación A (ClfA) de S. aureus aislado, un polipéptido de factor de aglutinación B (ClfB) de S. aureus aislado, y una proteína MntC de S. aureus aislada.

[0313] rClfA y rClfB se preparan y purifican tal como se describe en el ejemplo 1. MntC se prepara y purifica tal como se describe en el ejemplo 2. CP5 y CP8 aislados se preparan y purifican tal como se describe en el ejemplo 3 y se conjugan con CRM_{197} tal como se describe en el ejemplo 4.

[0314] Más particularmente, los procedimientos que se describen en los ejemplos previos anteriormente se usan para medir la inmunogenicidad y eficacia. Se realizan estudios para determinar si cada uno de los tres, cuatro o cinco componentes, cuando administra solo, o de forma conjunta, induce una respuesta inmunitaria. Estos mismos estudios se usan para determinar si la presencia de uno cualquiera de los cuatro o cinco componentes interfiere o no con la capacidad de cualquiera de los otros tres o cuatro componentes para inducir una respuesta inmunitaria. Además, se realizan estudios para determinar si los cuatro o cinco componentes, cuando se

someten a prueba solos, o cuando se someten a prueba de forma conjunta, conferirán protección en cualesquiera uno o más de los modelos animales que se describen anteriormente. Los cuatro o cinco componentes se administran como una dosis individual o como múltiples dosis a un animal, por ejemplo, ratones, ratas, conejos o primates no humanos, tal como se observa en los ejemplos previos anteriores. Se extrae la sangre de los animales y el suero se recoge y se somete a prueba para la presencia de anticuerpos para cada uno de los cuatro o cinco componentes. La presencia de anticuerpos específicos de antígeno se mide mediante cualquier inmunoensayo conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, un ELISA (véanse los ejemplos 11 a 29) o una inmonutransferencia de tipo Western (véase el ejemplo 1) se usa para evaluar la presencia ausencia de anticuerpos específicos de antígeno. Además, un ensayo opsonofagocítico se usa para determinar si los anticuerpos específicos de antígeno son eficaces en la mediación de la destrucción de los organismos estafilocócicos por células fagocíticas (véanse los ejemplos 11 a 29).

[0315] La eficacia *in vivo* se evalúa también usando cualquier uno o más del animal estudios que se describen anteriormente, tal como, pero sin limitarse a, el modelo de tubo incrustado; el modelo de bacteriemia murino; el modelo de infección en herida; el modelo de pielonefritis murino; el modelo de endocarditis de rata y el modelo murino de septicemia (véanse los ejemplos 11 a 30).

Ejemplo 32: Las combinaciones de antígenos de S. aureus generan anticuerpos en primates no humanos que potencian la destrucción de la cepa de S. Aureus Pfe5-1.

[0316] Se observó una eficacia mejorada, tal como se mide usando el ensayo de OPA, usando combinaciones de antígenos. Se realizó un estudio en primates no humanos se realizó en el que se inmunizaron grupos de 3 a 10 monos con vacunas de multiples componentes. Los animales recibieron una dosis individual de vacuna y se monitorizaron los títulos de OPA en el día 0 y dos semanas tras la vacunación. Los títulos de OPA se definieron como la dilución de suero requerida para destruir el 50 % de la cepa de S. aureus Pfe5-1 en un ensayo de OPA ensayo. Se observó un aumento de actividad para una combinación de 4 antígenos en comparación con una formuación de vacuna de 3 antígenos ($p = 0,0272$; figura 18).

LISTA DE SECUENCIAS

<110> ANDERSON, ANNALIESA
PAVLIAK, VILIAM
JANSEN, KATHRIN UTE
DODGE, INGRID LEA
BAKER, STEVEN MORRIS
NANRA, JASDEEP SINGH
MURPHY, ELLEN
GREEN, BRUCE ARTHUR
RUPPEN, MARK EDWARD
TIMOFEYEVA, YEKATERINA

<120> COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS DE ANTÍGENOS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
<130> AM102183
<140>
<141>
<160> 131
<170> PatentIn versión 3.5
<210> 1
<211> 927
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 1

atgaaaaaat tagtaccttt attattagcc ttattacttc tagttgctgc atgtggtact 60
ggtggtaaac aaagcagtga taagtcaaat ggcaaattaa aagtagtaac gacgaattca 120
attttatatg atatggctaa aaatgttggt ggagacaacg tcgatattca tagtattgta 180
cctgttggtc aagatcctca tgaatatgaa gttaaacctа aagatattaa aaagttaact 240
gacgctgacg ttattttata caacggatta aatttagaga ctggtaacgg ttggtttgaa 300
aaagccttag aacaggctgg taaatcatta aaagataaaa aagttatcgc agtatcaaaa 360
gatgttaaac ctatctattt aaacggtgaa gaaggcaaca aagataaaca agatccacac 420
gcatggttaa gtttagataa cggtattaaa tacgtaaaaa caattcaaca aacatttatc 480
gataacgaca aaaaacataa agcagattat gaaaagcaag gtaacaaata cattgctcaa 540
ttggaaaaat taaataatga cagtaaagac aaatttaatg acattccaaa agaacaacgt 600
gccatgatta caagtgaagg tgccttcaag tacttctcaa aacaatacgg tattacacca 660
ggttatattt gggaaattaa cactgaaaaa caaggtacac cagaacaaat gagacaagct 720
attgagtttg ttaaaaagca caaattaaaa cacttattag tagaaacaag tgttgataag 780
aaagcaatgg aaagtttatc tgaagaaacg aagaaagata tctttggtga agtgtacaca 840
gattcaatcg gtaaagaagg cactaaaggt gactcttact acaaaaatgat gaaatcaaat 900
attgaaactg tacacggaag catgaaa 927

<210> 2
<211> 309
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 2

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

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

<210> 3
<211> 927
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 3

atgaaaaaat tagtaccttt attattagcc ttattacttc tagttgctgc atgtggtact 60
ggtggtaaac aaagcagtga taagtcaaat ggcaaattaa aagtagtaac gacgaattca 120
attttatatg atatggctaa aaatgttggt ggagacaacg tcgatattca tagtattgta 180
cctgttggtc aagatcctca tgaatatgaa gttaaaccta aagatattaa aaagttaact 240
gacgctgaca ttattttata caacggatta aatttagaga ctggtaacgg ttggtttgaa 300
aaagccttag aacaggctgg taaatcatta aaagataaaa aagttatcgc agtatcaaaa 360
gatgttaaac ctatctattt aaacggtgaa gaaggcaaca aagataaaca agatccacac 420
gcatggttaa gtttagataa tggtattaaa tacgtaaaaa caattcaaca aacatttatc 480
gataacgaca aaaaacataa agcagattat gaaaagcaag gtaacaaata cattgctcaa 540
ttggaaaaat taaataatga cagtaaagac aaatttaatg acattccaaa agaacaacgt 600
gccatgatta caagtgaagg tgccttcaag tacttctcaa aacaatacgg tattacacca 660
ggttatattt gggaaattaa cactgaaaaa caaggtacac ctgaacaaat gagacaagct 720
attgagtttg ttaaaaagca caaattaaaa cacttattag tagaaacaag tgttgataag 780
aaagcaatgg aaagtttatc tgaagaaacg aagaaagata tctttggtga agtgtacaca 840
gattcaatcg gtaaagaagg cactaaaggt gactcttatt acaaaatgat gaaatcaaat 900
attgaaactg tacacggaag catgaaa 927

<210> 4
<211> 309
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 4

Met Lys Lys Leu Val Pro Leu Leu Leu Ala Leu Leu Leu Leu Val Ala
1 5 10 15
Ala Cys Gly Thr Gly Gly Lys Gln Ser Ser Asp Lys Ser Asn Gly Lys
20 25 30
Leu Lys Val Val Thr Thr Asn Ser Ile Leu Tyr Asp Met Ala Lys Asn
35 40 45
Val Gly Gly Asp Asn Val Asp Ile His Ser Ile Val Pro Val Gly Gln
50 55 60
Asp Pro His Glu Tyr Glu Val Lys Pro Lys Asp Ile Lys Lys Leu Thr

65 70 75 80
Asp Ala Asp Ile Ile Leu Tyr Asn Gly Leu Asn Leu Glu Thr Gly Asn
85 90 95
Gly Trp Phe Glu Lys Ala Leu Glu Gln Ala Gly Lys Ser Leu Lys Asp
100 105 110
Lys Lys Val Ile Ala Val Ser Lys Asp Val Lys Pro Ile Tyr Leu Asn
115 120 125
Gly Glu Glu Gly Asn Lys Asp Lys Gln Asp Pro His Ala Trp Leu Ser
130 135 140
Leu Asp Asn Gly Ile Lys Tyr Val Lys Thr Ile Gln Gln Thr Phe Ile
145 150 155 160
Asp Asn Asp Lys Lys His Lys Ala Asp Tyr Glu Lys Gln Gly Asn Lys
165 170 175
Tyr Ile Ala Gln Leu Glu Lys Leu Asn Asn Asp Ser Lys Asp Lys Phe
180 185 190
Asn Asp Ile Pro Lys Glu Gln Arg Ala Met Ile Thr Ser Glu Gly Ala
195 200 205
Phe Lys Tyr Phe Ser Lys Gln Tyr Gly Ile Thr Pro Gly Tyr Ile Trp
210 215 220
Glu Ile Asn Thr Glu Lys Gln Gly Thr Pro Glu Gln Met Arg Gln Ala
225 230 235 240
Ile Glu Phe Val Lys Lys His Lys Leu Lys His Leu Leu Val Glu Thr
245 250 255
Ser Val Asp Lys Lys Ala Met Glu Ser Leu Ser Glu Glu Thr Lys Lys
260 265 270
Asp Ile Phe Gly Glu Val Tyr Thr Asp Ser Ile Gly Lys Glu Gly Thr
275 280 285
Lys Gly Asp Ser Tyr Tyr Lys Met Met Lys Ser Asn Ile Glu Thr Val
290 295 300
His Gly Ser Met Lys
305

<210> 5
<211> 936
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 5

atgaaaaaat tagtaccttt attattagcc ttattacttc tagttgctgc atgtggtact 60
ggtggtaaac aaagcagtga taagtcaaat ggcaaattaa aagtagtaac gacgaattca 120
attttatatg atatggctaa aaatgttggt ggagacaacg tcgatattca tagtattgta 180
cctgttggtc aagatcctca tgaatatgaa gttaaaccta aagatattaa aaagttaact 240
gacgctgacg ttattttata caacggatta aatttagaga ctggtaacgg ttggtttgaa 300
aaagccttag aacaggctgg taaatcatta aaagataaaa aagttatcgc agtatcaaaa 360
gatgttaaac ctatctattt aaacggtgaa gaaggcaaca aagataaaca agatccacac 420
gcatggttaa gtttagataa cggtattaaa tacgtaaaaa caattcaaca aacatttatc 480
gataacgaca aaaaacataa agcagattat gaaaagcaag gtaacaaata cattgctcaa 540
ttggaaaaat taaataatga cagtaaagac agtaaagaca aatttaatga cattccaaaa 600
gaacaacgtg ccatgattac aagtgaaggt gccttcaagt acttctcaaa acaatacggt 660
attacaccag gttatatttg ggaaattaac actgaaaaac aaggtacacc tgaacaaatg 720
agacaagcta ttgagtttgt taaaaagcac aaattaaaac acttattagt agaaacaagt 780
gttgataaga aagcaatgga aagtttatct gaagaaacga agaaagatat ctttggtgaa 840
gtgtacacag attcaatcgg taaagaaggc actaaaggtg actcttacta caaaatgatg 900
aaatcaaata ttgaaactgt acacggaagc atgaaa 936

<210> 6
<211> 312
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 6

Met Lys Lys Leu Val Pro Leu Leu Leu Ala Leu Leu Leu Leu Val Ala
1 5 10 15
Ala Cys Gly Thr Gly Gly Lys Gln Ser Ser Asp Lys Ser Asn Gly Lys
20 25 30

Leu Lys Val Val Thr Thr Asn Ser Ile Leu Tyr Asp Met Ala Lys Asn
35 40 45
Val Gly Gly Asp Asn Val Asp Ile His Ser Ile Val Pro Val Gly Gln
50 55 60
Asp Pro His Glu Tyr Glu Val Lys Pro Lys Asp Ile Lys Lys Leu Thr
65 70 75 80
Asp Ala Asp Val Ile Leu Tyr Asn Gly Leu Asn Leu Glu Thr Gly Asn
85 90 95
Gly Trp Phe Glu Lys Ala Leu Glu Gln Ala Gly Lys Ser Leu Lys Asp
100 105 110
Lys Lys Val Ile Ala Val Ser Lys Asp Val Lys Pro Ile Tyr Leu Asn
115 120 125
Gly Glu Glu Gly Asn Lys Asp Lys Gln Asp Pro His Ala Trp Leu Ser
130 135 140
Leu Asp Asn Gly Ile Lys Tyr Val Lys Thr Ile Gln Gln Thr Phe Ile
145 150 155 160
Asp Asn Asp Lys Lys His Lys Ala Asp Tyr Glu Lys Gln Gly Asn Lys
165 170 175
Tyr Ile Ala Gln Leu Glu Lys Leu Asn Asn Asp Ser Lys Asp Ser Lys
180 185 190
Asp Lys Phe Asn Asp Ile Pro Lys Glu Gln Arg Ala Met Ile Thr Ser
195 200 205
Glu Gly Ala Phe Lys Tyr Phe Ser Lys Gln Tyr Gly Ile Thr Pro Gly
210 215 220
Tyr Ile Trp Glu Ile Asn Thr Glu Lys Gln Gly Thr Pro Glu Gln Met
225 230 235 240
Arg Gln Ala Ile Glu Phe Val Lys Lys His Lys Leu Lys His Leu Leu
245 250 255
Val Glu Thr Ser Val Asp Lys Lys Ala Met Glu Ser Leu Ser Glu Glu
260 265 270
Thr Lys Lys Asp Ile Phe Gly Glu Val Tyr Thr Asp Ser Ile Gly Lys
275 280 285
Glu Gly Thr Lys Gly Asp Ser Tyr Tyr Lys Met Met Lys Ser Asn Ile
290 295 300
Glu Thr Val His Gly Ser Met Lys
305 310

<210> 7
<211> 927
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 7

atgaaaaaat tagtaccttt attattagcc ttattacttt tagttgctgc atgtggtact 60
ggtggtaaac aaagcagtga taagtcaaat ggcaaactaa aagtagtaac gacgaattca 120
attttatatg atatggctaa aaatgttggt ggagacaacg tcgatattca tagtattgta 180
cctgttggtc aagatcctca tgaatatgaa gttaaaccta aagatattaa aaagttaact 240
gacgctgacg ttatttttata caacggatta aatttagaga ctggtaacgg ttggtttgaa 300
aaagccttag aacaggctgg taaatcatta aaagataaaa aagttatcgc agtatcaaaa 360
gatgttaaac ctatctattt aaacggtgaa gaaggcaaca aagataaaca agatccacac 420
gcatggttaa gtttagataa cggtattaaa tacgtaaaaa caattcaaca aacatttatc 480
gataacgaca aaaaacataa agcagattat gaaaagcaag gtaacaaata cattgctcaa 540
ttggaaaaat taaataatga cagtaaagac aaatttaatg acattccaaa agaacaacgt 600
gccatgatta caagtgaagg tgccttcaaa tacttctcaa aacaatacgg tattacacca 660
ggttatattt gggaaattaa cactgaaaaa caaggtacac cagaacaaat gagacaagct 720
attgagtttg ttaaaaaaca caaattaaaa cacttattag tagaaacaag tgttgataag 780
aaagcaatgg aaagtttatc tgaagaaacg aagaaagata tctttggtga agtgtacaca 840
gattcaatcg gtaaagaagg cactaaaggt gactcttact acaaaatgat gaaatcaaat 900
attgatactg tacacggaag catgaaa 927

<210> 8
<211> 309
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 8
Met Lys Lys Leu Val Pro Leu Leu Leu Ala Leu Leu Leu Leu Val Ala
1 5 10 15
Ala Cys Gly Thr Gly Gly Lys Gln Ser Ser Asp Lys Ser Asn Gly Lys
20 25 30
Leu Lys Val Val Thr Thr Asn Ser Ile Leu Tyr Asp Met Ala Lys Asn
35 40 45
Val Gly Gly Asp Asn Val Asp Ile His Ser Ile Val Pro Val Gly Gln
50 55 60
Asp Pro His Glu Tyr Glu Val Lys Pro Lys Asp Ile Lys Lys Leu Thr
65 70 75 80
Asp Ala Asp Val Ile Leu Tyr Asn Gly Leu Asn Leu Glu Thr Gly Asn
85 90 95
Gly Trp Phe Glu Lys Ala Leu Glu Gln Ala Gly Lys Ser Leu Lys Asp
100 105 110
Lys Lys Val Ile Ala Val Ser Lys Asp Val Lys Pro Ile Tyr Leu Asn
115 120 125
Gly Glu Glu Gly Asn Lys Asp Lys Gln Asp Pro His Ala Trp Leu Ser
130 135 140
Leu Asp Asn Gly Ile Lys Tyr Val Lys Thr Ile Gln Gln Thr Phe Ile
145 150 155 160
Asp Asn Asp Lys Lys His Lys Ala Asp Tyr Glu Lys Gln Gly Asn Lys
165 170 175
Tyr Ile Ala Gln Leu Glu Lys Leu Asn Asn Asp Ser Lys Asp Lys Phe
180 185 190
Asn Asp Ile Pro Lys Glu Gln Arg Ala Met Ile Thr Ser Glu Gly Ala
195 200 205
Phe Lys Tyr Phe Ser Lys Gln Tyr Gly Ile Thr Pro Gly Tyr Ile Trp
210 215 220
Glu Ile Asn Thr Glu Lys Gln Gly Thr Pro Glu Gln Met Arg Gln Ala
225 230 235 240
Ile Glu Phe Val Lys Lys His Lys Leu Lys His Leu Leu Val Glu Thr
245 250 255
Ser Val Asp Lys Lys Ala Met Glu Ser Leu Ser Glu Glu Thr Lys Lys
260 265 270
Asp Ile Phe Gly Glu Val Tyr Thr Asp Ser Ile Gly Lys Glu Gly Thr
275 280 285
Lys Gly Asp Ser Tyr Tyr Lys Met Met Lys Ser Asn Ile Asp Thr Val
290 295 300
His Gly Ser Met Lys
305
<210> 9
<211> 927
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 9
atgaaaaaat tagtaccttt attattagcc ttattacttc tagttgctgc atgtggtact 60
gatggtaaac aaagcagtga taagtcaaat ggcaaattaa aagtagtaac gacgaattca 120
attttatatg atatggctaa aaatgttggt ggagacaacg tcgatattca tagtattgta 180
cctgttggtc aagatcctca tgaatatgaa gttaaaccta aagatattaa aaagttaact 240
gacgctgacg ttatttttata caacggatta aatttagaga ctggtaacgg ttggtttgaa 300
aaagccttag aacaggctgg taaatcatta aaagataaaa aagttatcgc agtatcaaaa 360
gatgttaaac ctatctattt aaacggtgaa gaaggcaaca aagataaaca agatccacac 420
gcatggttaa gtttagataa cggtattaaa tacgtaaaaa caattcaaca aacatttatc 480
gataacgaca aaaaacataa agcagattat gaaaagcaag gtaacaaata cattgctcaa 540
ttggaaaaat taaataatga cagtaaagac aaatttaatg acattccaaa agaacaacgt 600
gccatgatta caagtgaagg tgccttcaag tacttctcaa aacaatacgg tattacacca 660
ggttatattt gggaaattaa cactgaaaaa caaggtacac ctgaacaaat gagacaagct 720
attgagtttg ttaaaaagca caaattaaaa cacttattag tagaaacaag tgttgataag 780
aaagcaatgg aaagtttatc tgaagaaacg aagaaagata tctttggtga agtgtacaca 840
gattcaatcg gtaaagaagg cactaaaggt gactcttact acaaaatgat gaaatcaaat 900

attgaaactg tacacggaag catgaaa 927

<210> 10
<211> 309
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 10

```
Met Lys Lys Leu Val Pro Leu Leu Leu Ala Leu Leu Leu Leu Val Ala
1               5                  10                  15
Ala Cys Gly Thr Asp Gly Lys Gln Ser Ser Asp Lys Ser Asn Gly Lys
            20                  25                  30
Leu Lys Val Val Thr Thr Asn Ser Ile Leu Tyr Asp Met Ala Lys Asn
        35                  40                  45
Val Gly Gly Asp Asn Val Asp Ile His Ser Ile Val Pro Val Gly Gln
    50                  55                  60
Asp Pro His Glu Tyr Glu Val Lys Pro Lys Asp Ile Lys Lys Leu Thr
65                  70                  75                  80
Asp Ala Asp Val Ile Leu Tyr Asn Gly Leu Asn Leu Glu Thr Gly Asn
                85                  90                  95
Gly Trp Phe Glu Lys Ala Leu Glu Gln Ala Gly Lys Ser Leu Lys Asp
            100                 105                 110
Lys Lys Val Ile Ala Val Ser Lys Asp Val Lys Pro Ile Tyr Leu Asn
        115                 120                 125
Gly Glu Glu Gly Asn Lys Asp Lys Gln Asp Pro His Ala Trp Leu Ser
    130                 135                 140
Leu Asp Asn Gly Ile Lys Tyr Val Lys Thr Ile Gln Gln Thr Phe Ile
145                 150                 155                 160
Asp Asn Asp Lys Lys His Lys Ala Asp Tyr Glu Lys Gln Gly Asn Lys
                165                 170                 175
Tyr Ile Ala Gln Leu Glu Lys Leu Asn Asn Asp Ser Lys Asp Lys Phe
            180                 185                 190
Asn Asp Ile Pro Lys Glu Gln Arg Ala Met Ile Thr Ser Glu Gly Ala
        195                 200                 205
Phe Lys Tyr Phe Ser Lys Gln Tyr Gly Ile Thr Pro Gly Tyr Ile Trp
    210                 215                 220
Glu Ile Asn Thr Glu Lys Gln Gly Thr Pro Glu Gln Met Arg Gln Ala
225                 230                 235                 240
Ile Glu Phe Val Lys Lys His Lys Leu Lys His Leu Leu Val Glu Thr
                245                 250                 255
Ser Val Asp Lys Lys Ala Met Glu Ser Leu Ser Glu Glu Thr Lys Lys
            260                 265                 270
Asp Ile Phe Gly Glu Val Tyr Thr Asp Ser Ile Gly Lys Glu Gly Thr
        275                 280                 285
Lys Gly Asp Ser Tyr Tyr Lys Met Met Lys Ser Asn Ile Glu Thr Val
    290                 295                 300
His Gly Ser Met Lys
305
```

<210> 11
<211> 927
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 11

```
atgaaaaaat tagtaccttt attattagcc ttattacttc tagttgctgc atgtggtact     60
ggtggtaaac aaagcagtga taagtcaaat ggcaaattaa aagtagtaac gacgaattca    120
attttatatg atatggctaa aaatgttggt ggagacaacg tcgatattca tagtattgta    180
cctgttggtc aagatcctca tgaatatgaa gttaaaccta aagatattaa aaagttaact    240
gacgctgacg ttattttata caacggatta aatttagaga ctggtaacgg ttggtttgaa    300
aaagccttag aacaggctgg taaatcatta aaagataaaa aagttatcgc agtatcaaaa    360
gatgttaaac ctatctattt aaacggtgaa gaaggcaaca aagataaaca agatccacac    420
gcatggttaa gtttagataa cggtattaaa tacgtaaaaa caattcaaca aacatttatc    480
gataacgaca aaaaacataa agcatattat gaaaagcaag gtaacaaata cattgctcaa    540
ttggaaaaat taaataatga cagtaaagac aaatttaatg acattccaaa agaacaacgt    600
```

gccatgatta caagtgaagg tgccttcaag tacttctcaa aacaatacgg tattacacca 660
ggttatattt gggaaattaa cactgaaaaa caaggtacac ctgaacaaat gagacaagct 720
attgagtttg ttaaaaagca caaattaaaa cacttattag tagaaacaag tgttgataag 780
aaagcaatgg aaagtttatc tgaagaaacg aagaaagata tctttggtga agtgtacaca 840
gattcaatcg gtaaagaagg cactaaaggt gactcttact acaaaatgat gaaatcaaat 900
attgatactg tacacggaag catgaaa 927

<210> 12
<211> 309
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 12

Met Lys Lys Leu Val Pro Leu Leu Leu Ala Leu Leu Leu Leu Val Ala
1 5 10 15
Ala Cys Gly Thr Gly Gly Lys Gln Ser Ser Asp Lys Ser Asn Gly Lys
20 25 30
Leu Lys Val Val Thr Thr Asn Ser Ile Leu Tyr Asp Met Ala Lys Asn
35 40 45
Val Gly Gly Asp Asn Val Asp Ile His Ser Ile Val Pro Val Gly Gln
50 55 60
Asp Pro His Glu Tyr Glu Val Lys Pro Lys Asp Ile Lys Lys Leu Thr
65 70 75 80
Asp Ala Asp Val Ile Leu Tyr Asn Gly Leu Asn Leu Glu Thr Gly Asn
85 90 95
Gly Trp Phe Glu Lys Ala Leu Glu Gln Ala Gly Lys Ser Leu Lys Asp
100 105 110
Lys Lys Val Ile Ala Val Ser Lys Asp Val Lys Pro Ile Tyr Leu Asn
115 120 125
Gly Glu Glu Gly Asn Lys Asp Lys Gln Asp Pro His Ala Trp Leu Ser
130 135 140
Leu Asp Asn Gly Ile Lys Tyr Val Lys Thr Ile Gln Gln Thr Phe Ile
145 150 155 160
Asp Asn Asp Lys Lys His Lys Ala Tyr Tyr Glu Lys Gln Gly Asn Lys
165 170 175
Tyr Ile Ala Gln Leu Glu Lys Leu Asn Asn Asp Ser Lys Asp Lys Phe
180 185 190
Asn Asp Ile Pro Lys Glu Gln Arg Ala Met Ile Thr Ser Glu Gly Ala
195 200 205
Phe Lys Tyr Phe Ser Lys Gln Tyr Gly Ile Thr Pro Gly Tyr Ile Trp
210 215 220
Glu Ile Asn Thr Glu Lys Gln Gly Thr Pro Glu Gln Met Arg Gln Ala
225 230 235 240
Ile Glu Phe Val Lys Lys His Lys Leu Lys His Leu Leu Val Glu Thr
245 250 255
Ser Val Asp Lys Lys Ala Met Glu Ser Leu Ser Glu Glu Thr Lys Lys
260 265 270
Asp Ile Phe Gly Glu Val Tyr Thr Asp Ser Ile Gly Lys Glu Gly Thr
275 280 285
Lys Gly Asp Ser Tyr Tyr Lys Met Met Lys Ser Asn Ile Asp Thr Val
290 295 300
His Gly Ser Met Lys
305

<210> 13
<211> 927
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 13

atgaaaaaat tagtaccttt attattagcc ttattacttc tagttgctgc atgtggtact 60
ggtggtaaac aaagcagtga taagtcaaat ggcaaattaa aagtagtaac gacgaattca 120
attttatatg atatggctaa aaatgttggt ggagacaacg tcgatattca tagtattgta 180
cctgttggtc aagatcctca tgaatatgaa gttaaaccta aagatattaa aaagttaact 240
gacgctgacg ttattttata caacggatta aatttagaga ctggtaacgg ttggtttgaa 300

aaagccttag aacaggctgg taaatcatta aaagataaaa aagttatcgc agtatcaaaa 360
gatgttaaac ctatctattt aaacggtgaa gaaggcaaca aagataaaca agatccacac 420
gcatggttaa gtttagataa cggtattaaa tacgtaaaaa caattcaaca aacatttatc 480
gataacgaca aaaaacataa agcagattat gaaaagcaag gtaacaaata cattgctcaa 540
ttggaaaaat taaataatga cagtaaagac aaatttaatg acrttccaaa agaacaacgt 600
gccatgatta caagtgaagg tgccttcaag tacttctcaa aacaatacgg tattacacca 660
ggttatattt gggaaattaa cactgaaaaa caaggtacac ctgaacaaat gagacaagct 720
attgagtttg ttaaaaagca caaattaaaa cacttattag tagaaacaag tgttgataag 780
aaagcaatgg aaagtttatc tgaagaaacg aagaaagata tctttggtga agtgtacaca 840
gattcaatcg gtaaagaagg cactaaaggt gactcttact acaaaatgat gaaatcaaat 900
attgatactg tacacggaag catgaaa 927

<210> 14
<211> 309
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<220>
<221> MOD_RES
<222> (195)..(195)
<223> Cualquier aminoácido
<400> 14

Met Lys Lys Leu Val Pro Leu Leu Leu Ala Leu Leu Leu Leu Val Ala
1 5 10 15
Ala Cys Gly Thr Gly Gly Lys Gln Ser Ser Asp Lys Ser Asn Gly Lys
20 25 30
Leu Lys Val Val Thr Thr Asn Ser Ile Leu Tyr Asp Met Ala Lys Asn
35 40 45
Val Gly Gly Asp Asn Val Asp Ile His Ser Ile Val Pro Val Gly Gln
50 55 60
Asp Pro His Glu Tyr Glu Val Lys Pro Lys Asp Ile Lys Lys Leu Thr
65 70 75 80
Asp Ala Asp Val Ile Leu Tyr Asn Gly Leu Asn Leu Glu Thr Gly Asn
85 90 95
Gly Trp Phe Glu Lys Ala Leu Glu Gln Ala Gly Lys Ser Leu Lys Asp
100 105 110
Lys Lys Val Ile Ala Val Ser Lys Asp Val Lys Pro Ile Tyr Leu Asn
115 120 125
Gly Glu Glu Gly Asn Lys Asp Lys Gln Asp Pro His Ala Trp Leu Ser
130 135 140
Leu Asp Asn Gly Ile Lys Tyr Val Lys Thr Ile Gln Gln Thr Phe Ile
145 150 155 160
Asp Asn Asp Lys Lys His Lys Ala Asp Tyr Glu Lys Gln Gly Asn Lys
165 170 175
Tyr Ile Ala Gln Leu Glu Lys Leu Asn Asn Asp Ser Lys Asp Lys Phe
180 185 190
Asn Asp Xaa Pro Lys Glu Gln Arg Ala Met Ile Thr Ser Glu Gly Ala
195 200 205
Phe Lys Tyr Phe Ser Lys Gln Tyr Gly Ile Thr Pro Gly Tyr Ile Trp
210 215 220
Glu Ile Asn Thr Glu Lys Gln Gly Thr Pro Glu Gln Met Arg Gln Ala
225 230 235 240
Ile Glu Phe Val Lys Lys His Lys Leu Lys His Leu Leu Val Glu Thr
245 250 255
Ser Val Asp Lys Lys Ala Met Glu Ser Leu Ser Glu Glu Thr Lys Lys
260 265 270
Asp Ile Phe Gly Glu Val Tyr Thr Asp Ser Ile Gly Lys Glu Gly Thr
275 280 285
Lys Gly Asp Ser Tyr Tyr Lys Met Met Lys Ser Asn Ile Asp Thr Val
290 295 300
His Gly Ser Met Lys
305

<210> 15

<211> 1626
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 15

ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aagcagaata agtattcgat tagacgtttt 60
acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaacgatac tatttgggat aggcaatcat 120
caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacgcaat cttcgaaaaa taatgcaagt 180
gcagattccg aaaaaaacaa tacgatagaa acacctcaat taaatacaac ggctaatgat 240
acatctgata ttagtgcaaa cacaaacagt gcgaatgtag atagcacagc aaaaccaatg 300
tctacacaaa cgagcaatac cactacaaca gagccagctt caacaaatga aacacctcac 360
ccgacggcaa ttaaagatca agcaactgct gcaaaaatgc aagatcaaac tgttcctcaa 420
gaagcaaatt ctcaagtaga taataaaaca acgaatgatg ctaatagcat agcaacaaac 480
agtgagctta aaaatcctca aacattagat ttaccacaat catcaccaca aacgatttcc 540
aatgcgcaag gaactagtaa accaagtgtt agaacgagag ctgtacgtag tcttgcagtt 600
actgaacctg tagtaaatgc tgctgatgct aaaggtacaa atgtaaatgg tcaagttacg 660
gcaagtgatt tcaagttaga aaagactaca tttgacccta accaaagtgg taacacattt 720
atggcggcaa attttaaagt ggcagggaaa gtgaaatcag gggattattt tacagcgaag 780
ttaccagata gtgtaactgg taatggagat gtggattact ctaactcgaa taatacgatg 840
ccaattgcag atattaaaag tacgaatggc gatgttgtag ctaaagcaac atatgatatc 900
ttgactaaga cgtatacatt tgtctttaca gattatgtaa atgataaaga aaatattaac 960
ggacaatttt cattaccatt atttacagac agagcaaagg cacctaaatc aggaacatat 1020
gatgcaaata ttaatattgc ggatgaaatg tttaataata aaattactta taactatagt 1080
tcaccaattg caggaattga taagccaaat ggcgcgaaca tttcttctca aattattggt 1140
gtagatacag cttcaggtca aaacacatac aagcaaacgg tatttgttaa ccctaagcaa 1200
cgagttttag gtaatacgtg ggtgtatatt aaaggttacc aagataaaat cgaagaaagt 1260
agcggtaaag taagtgctac agatacaaaa ctgagaattt ttgaagtgaa tgatacatct 1320
aaattatcag atagctacta tgcagaccca aatgactcta accttaaaga agtaactgat 1380
caatttaaag ataaaatttc atacaaatac gataacgtag caagtattaa ttttggtgat 1440
ataaataaaa cgtatgtcgt tttagtcgaa ggtcattatg ataatactgg taaaaacttg 1500
aaaacacagg ttattcaaga aaatattgac ccagcgacag gtaaagatta cagtattttc 1560
ggttggaata atgagaatgt tgtacgttat ggaggcggaa gtgctgatgg tgattcagca 1620
gtaaat 1626

<210> 16
<211> 542
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 16

Leu 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 Thr Ile Glu Thr Pro Gln Leu Asn Thr Thr Ala Asn Asp
65 70 75 80
Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn Val Asp Ser Thr
85 90 95
Ala 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 His Pro Thr Ala Ile Lys Asp 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
145 150 155 160
Ser Glu Leu Lys Asn Pro 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

191

Arg Ala Val Arg Ser Leu Ala Val Thr Glu Pro Val Val Asn Ala Ala
195 200 205
Asp Ala Lys Gly Thr Asn Val Asn Gly Gln Val Thr Ala Ser Asp Phe
210 215 220
Lys Leu Glu Lys Thr Thr Phe Asp Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Phe
225 230 235 240
Met Ala Ala Asn Phe Lys Val Ala Gly Lys Val Lys Ser Gly Asp Tyr
245 250 255
Phe Thr Ala Lys Leu Pro Asp Ser Val 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 Asp Lys Glu Asn Ile Asn
305 310 315 320
Gly Gln Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
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 Asp
450 455 460
Lys Ile Ser Tyr Lys Tyr Asp Asn Val Ala Ser Ile Asn Phe Gly Asp
465 470 475 480
Ile Asn 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 Ile Asp Pro Ala
500 505 510
Thr Gly Lys 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
530 535 540

<210> 17
<211> 1626
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 17

ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aagcagaata agtattcgat tagacgtttt 60
acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaactatac tatttgggat aggcaatcat 120
caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacgcaat cttcgaaaaa taatgcaagt 180
gcagattccg aaaaaaacaa tacgatagaa acacctcaat taaatacaac ggctaatgat 240
acatctgata ttagtgcaaa cacaaacagt gcgaatgtag atagcacagc aaaaacaatg 300
tctacacaaa cgagcaatac cactacaaca gagccagctt caacaaatga aacacctcaa 360
ccgacggcaa ttaaagatca agcaactgct gcaaaaatgc aagatcaaac tgttcctcaa 420
gaagcaaatt ctcaagtaga taataaaaca acgaatgatg ctaataacat agcaacaaac 480
agtgagctta aaaatcctca aacattagat ttaccacaat catcaccaca aacgatttcc 540
aatgcgcaag gaactagtaa accaagtgtt agaacgagag ctgtacgtag tcttgcagtt 600
gctgaacctg tagtaaatgc tgctgatgct aaaggtacaa atgtaaatga taaagttacg 660
gcaagtgatt tcaagttaga aaagactgca tttgacccta accaaagtgg taacacattt 720

atggcggcaa attttaaagt gactggacaa gtgaaatcag gggattattt tacagcgaag 780
ttaccagata gtgtaactgg taatggagac gtggattact ctaattcaaa taatacgatg 840
ccaattgcag acattaaaag tacgaatggc gatgttgtag ctaaagcaac atatgatatc 900
ttgactaaga cgtatacatt tgtctttaca gattatgtaa atgataaaga aaatattaac 960
ggacaatttt cattaccttt atttacagac cgagcaaagg cacctaaatc aggaacatat 1020
gatgcaaata ttaatattgc ggatgaaatg tttgataata aaattactta taactatagt 1080
tcgccaattg caggaattga taagccaaat ggcgcgaaca tttcttctca aattattggt 1140
gtagatacag cttcaggtca aaacacatac aagcaaacgg tatttgttaa ccctaagcaa 1200
cgagttttag gtaatacgtg ggtgtatatt aaaggttacc aagataaaat cgaagaaagt 1260
agcggtaaag taagtgctac agatacaaaa ctgagaattt ttgaagtgaa tgatacatct 1320
aaattatcag atagctacta tgcagaccca aatgactcta accttaaaga agtgactggt 1380
gagtttaaag ataaaatttc atacaaatac gataacgtag caagtattaa ttttggtgat 1440
ataaataaaa cgtatgttgt attagtggaa ggtcactatg ataatactgg taaaaacttg 1500
aaaacacagg ttattcaaga aaatattgac ccagcgacag gtaaagacta cagtattttc 1560
ggttggaata atgagaatgt tgtacgttat ggaggcggaa gtgctgatgg tgattcagca 1620
gtaaat 1626

<210> 18
<211> 542
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 18

Leu 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 Thr Ile Glu Thr Pro Gln Leu Asn Thr Thr Ala Asn Asp
65 70 75 80
Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn Val Asp Ser Thr
85 90 95
Ala Lys Thr 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 Asp 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 Asn Ile Ala Thr Asn
145 150 155 160
Ser Glu Leu Lys Asn Pro 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 Asp Phe
210 215 220
Lys Leu Glu Lys Thr Ala Phe Asp Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Phe
225 230 235 240
Met Ala Ala Asn Phe Lys Val Thr Gly Gln Val Lys Ser Gly Asp Tyr
245 250 255
Phe Thr Ala Lys Leu Pro Asp Ser Val 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 Asp Lys Glu Asn Ile Asn
305 310 315 320

192

Gly Gln Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
325 330 335
Ser Gly Thr Tyr Asp Ala Asn Ile Asn Ile Ala Asp Glu Met Phe Asp
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 Gly Glu Phe Lys Asp
450 455 460
Lys Ile Ser Tyr Lys Tyr Asp Asn Val Ala Ser Ile Asn Phe Gly Asp
465 470 475 480
Ile Asn 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 Ile Asp Pro Ala
500 505 510
Thr Gly Lys 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
530 535 540

<210> 19
<211> 1626
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 19

ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aagcagaata agtattcgat tagacgtttt 60
acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaactatac tatttgggat aggcaatcat 120
caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacgcaat cttcgaaaaa taatgcaagt 180
gcagattccg aaaaaaacaa tacgatagaa acacctcaat taaatacaac ggctaatgat 240
acatctgata ttagtgcaaa cacaaacagt gcgaatgtag atagcacagc aaaaccaatg 300
tctacacaaa cgagcaatac cactacaaca gagccagctt caacaaatga aacacctcaa 360
ccgacggcaa ttaaagatca agcaactgct gcaaaaatgc aagatcaaac tgttcctcaa 420
gaagcaaatt ctcaagtaga taataaaaca acgaatgatg ctaatagcat agcgacaaac 480
agcgagctta aaaatcctca atcattagat ttaccacaat catcaccaca aacgatttcc 540
aatgcgcaag gaactagtaa accaagtgtt agaacgagag ctgtacgtag tcttgcagtt 600
gctgaacctg tagtaaatgc tgctgatgct aaaggtacaa atgtaaatga taaagttacg 660
gcaaaagatt ttcaattaga aaagactaca tttgacccta accaaagtgg taatactttt 720
atggcggcaa actttacagt gactggacaa gtgaaatcag gggattattt tacagcgaag 780
ttaccagata gtgtaactgg taatggagac gtggattact ctaattcaaa taatacgatg 840
ccaattgcag atatagtaaa cgataaaaat gaagttgtag caaaagcgac atatgatatt 900
ttgactaaga catatacatt tgtctttaca gattatgtaa atgataagca aaatattaat 960
gggaaatttt cattaccatt atttacagac cgagcaaagg cacctaaatc aggaatatat 1020
gatgcgaata ttaatattgc ggatgaaatg tttaataata aaattactta taactatagt 1080
tcgccaattg caggaattga taagccaaat ggcgcgaaca tttcttctca aattattggt 1140
gtagatacag cttcaggtca aaatacatac aagcaaacgg tatttgttaa ccctaagcaa 1200
cgagttttag gtaatacgtg ggtgtatatt aaaggttacc aagataaaat cgaagaaagt 1260
agcggtaaag taagtgctac agatacaaaa ctgagaattt ttgaagtgaa tgatacatct 1320
aaattatcag atagctacta tgcggaccca aatgactcta accttaaaga agtgactggt 1380
gagtttaata atagaatttt ttatgaacat ccaaacgtag caagtattaa ttttggtgat 1440
ataaataaaa cgtatgtcgt tttagttgaa ggtcactatg ataatactgg taaaaacttg 1500
aaaacacagg ttattcaaga aaatattgac ccagcgacag gtaaagacta cagtattttc 1560
ggatggaata atgagaatgt tgtacgttat ggtggtggaa gtgctgatgg tgattcagca 1620
gtaaat 1626

<210> 20
<211> 542
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 20

```
Leu 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 Thr Ile Glu Thr Pro Gln Leu Asn Thr Thr Ala Asn Asp
65                  70                  75                  80
Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn Val Asp Ser Thr
                85                  90                  95
Ala 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 Asp 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                 160
Ser Glu Leu Lys Asn Pro Gln Ser 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 Lys Asp Phe
    210                 215                 220
Gln Leu Glu Lys Thr Thr Phe Asp Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Phe
225                 230                 235                 240
Met Ala Ala Asn Phe Thr Val Thr Gly Gln Val Lys Ser Gly Asp Tyr
                245                 250                 255
Phe Thr Ala Lys Leu Pro Asp Ser Val Thr Gly Asn Gly Asp Val Asp
            260                 265                 270
Tyr Ser Asn Ser Asn Asn Thr Met Pro Ile Ala Asp Ile Val Asn Asp
        275                 280                 285
Lys Asn Glu 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 Asp Lys Gln Asn Ile Asn
305                 310                 315                 320
Gly Lys Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
                325                 330                 335
Ser Gly Ile 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
```

193

Asp Pro Asn Asp Ser Asn Leu Lys Glu Val Thr Gly Glu Phe Asn Asn
450 455 460
Arg Ile Phe Tyr Glu His Pro Asn Val Ala Ser Ile Asn Phe Gly Asp
465 470 475 480
Ile Asn 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 Ile Asp Pro Ala
500 505 510
Thr Gly Lys 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
530 535 540

<210> 21
<211> 1626
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 21

ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aagcagaata agtattcgat tagacgtttt 60
acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaactatac tatttgggat aggcaatcat 120
caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacgcaat cttcgaaaaa taatgcaagt 180
gcagattccg aaaaaaacaa tacgatagaa acacctcaat taaatacaac ggctaatgat 240
acatctgata ttagtgcaaa cacaaacagt gcgaatgtag atagcacagc aaaaccaatg 300
tctacacaaa cgagcaatac cactacaaca gagccagctt caacaaatga aacacctcaa 360
ccgacggcaa ttaaagatca agcaactgct gcaaaaatgc aagatcgaac tgttcctcaa 420
gaagcaaatt ctcaagtaga taataaaaca acgaatgatg ctaatagcat aacaacaaac 480
agtgagctta aaaatcctca aacattagat ttaccacaat catcaccaca aacgatttcc 540
aatgcgcaag gaactagtaa accaagtgtt agaacgagag ctgtacgtag tcttgcagtt 600
gctgaacctg tagtaaatgc tgctgatgct aaaggcacaa atgtaaatga taaagttacg 660
gcaaaagatt ttcaattaga aaagactaca tttgacccta accaaagtgg taatactttt 720
atggcggcaa actttacagt gactggacaa gtgaaatcag gggattattt tacagcgaag 780
ttaccagaaa gtttaactgg taatggagac gtggattact ctaactcgaa taatacgatg 840
ccaattgcag atattaaaag tacgaatggc aatgttgtag ctaaagcaac atatgatatc 900
ttgactaaga cgtatacatt tgtctttaca gattatgtaa atgataaaga aaatattaac 960
ggacaatttt cattaccttt atttacagac cgagcaaagg cacctaaatc aggaacatat 1020
gatgcaaata ttaatattgc ggatgaaatg tttaacaata aaattactta taactatagt 1080
tcaccaattg caggaattga taagccaaat ggcgcgaaca tttcttctca aattattggt 1140
gtagatacag cttcaggtca aaacacatac aagcaaacgg tatttgttaa ccctaagcaa 1200
cgagttttag gtaatacgtg ggtgtatatt aaaggttacc aagataaaat cgaagaaagt 1260
agcggtaaag taagtgctac agatacaaaa ctgagaattt ttgaagtgaa tgatacatct 1320
aaattatcag atagctacta tgcggaccca aatgactcta atcttaaaga agtaactgat 1380
caatttaagg ataaaatcac ttataaatac caaaatgtag caagtattaa ttttggtgat 1440
attactaaaa cgtatgttgt attagtggaa ggtcactatg ataatactgg taaaaacttg 1500
aaaacacagg ttattcaaga aaatattgac ccagcgacag gtaaagacta cagtattttc 1560
ggatggaata atgagaatgt tgtacgttat ggtggtggaa gtgctgatgg tgattcagca 1620
gtaaat 1626

<210> 22
<211> 542
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 22

Leu 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 Thr Ile Glu Thr Pro Gln Leu Asn Thr Thr Ala Asn Asp
65 70 75 80
Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn Val Asp Ser Thr

85 90 95
Ala 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 Asp Gln Ala
115 120 125
Thr Ala Ala Lys Met Gln Asp Arg Thr Val Pro Gln Glu Ala Asn Ser
130 135 140
Gln Val Asp Asn Lys Thr Thr Asn Asp Ala Asn Ser Ile Thr Thr Asn
145 150 155 160
Ser Glu Leu Lys Asn Pro 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 Lys Asp Phe
210 215 220
Gln Leu Glu Lys Thr Thr Phe Asp Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Phe
225 230 235 240
Met Ala Ala Asn Phe Thr Val Thr Gly Gln Val Lys Ser Gly Asp Tyr
245 250 255
Phe Thr Ala Lys Leu Pro Glu 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 Asn 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 Asp Lys Glu Asn Ile Asn
305 310 315 320
Gly Gln Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
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 Asp
450 455 460
Lys Ile Thr Tyr Lys Tyr Gln Asn Val Ala Ser Ile Asn 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 Ile Asp Pro Ala
500 505 510
Thr Gly Lys 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
530 535 540

<210> 23
<211> 1620
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 23
ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aagcagaata agtattcgat tagacgtttt 60
acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaactatac tatttgggat aggcaatcat 120
caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacgcaat cttcgaaaaa taatgcaagt 180
gcagattccg aaaaaaacaa tacgatagaa acacctcaat taaatactaa tgatacatct 240
gatattagtg caaacacaaa cagtgcgaat gtagatagca cagcaaaacc aatgtctaca 300
caaacgagca ataccactac aacagagcca gctttcaacaa atgaaacacc tcaaccgacg 360
gcaattaaag atcaagcaac tgctgcaaaa atgcaagatc gaactgttcc tcaagaagca 420
aatttctcaag tagataataa aacaacgaat gatgctaata gcataacaac aaacagtgag 480
cttaaaaatc ctcaaacatt agatttacca caatcatcac cacaaacgat ttccaatgcg 540
caaggaacta gtaaaccaag tgttagaacg agagctgtac gtagtcttgc agttgctgaa 600
cctgtagtaa atgctgctga tgctaaaggc acaaatgtaa atgataaagt tacggcaaaa 660
gattttcaat tagaaaagac tacatttgac cctaaccaaa gtggtaatac ttttatggcg 720
gcaaacttta cagtgactgg acaagtgaaa tcaggggatt attttacagc gaagttacca 780
gaaagtttaa ctggtaatgg agacgtggat tactctaact cgaataatac gatgccaatt 840
gcagatatta aaagtacgaa tggcaatgtt gtagctaaag caacatatga tatcttgact 900
aagacgtata catttgtctt tacagattat gtaaatgata aagaaaatat taacggacaa 960
ttttcattac ctttatttac agaccgagca aaggcaccta aatcaggaac atatgatgca 1020
aatattaata ttgcggatga aatgtttaac aataaaatta cttataacta tagttcacca 1080
attgcaggaa ttgataagcc aaatggcgcg aacatttctt ctcaaattat tggtgtagat 1140
acagcttcag gtcaaaacac atacaagcaa acggtatttg ttaaccctaa gcaacgagtt 1200
ttaggtaata cgtgggtgta tattaaaggt taccaagata aaatcgaaga aagtagcggt 1260
aaagtaagtg ctacagatac aaaactgaga atttttgaag tgaatgatac atctaaatta 1320
tcagatagct actatgcgga cccaaatgac tctaatctta aagaagtaac tgatcaattt 1380
aaggataaaa tcacttataa ataccaaaat gtagcaagta ttaattttgg tgatattact 1440
aaaacgtatg ttgtattagt ggaaggtcac tatgataata ctggtaaaaa cttgaaaaca 1500
caggttattc aagaaaatat tgacccagcg acaggtaaag actacagtat tttcggatgg 1560
aataatgaga atgttgtacg ttatggtggt ggaagtgctg atggtgattc agcagtaaat 1620
<210> 24
<211> 540
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 24

Leu	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	Thr	Ile	Glu	Thr	Pro	Gln	Leu	Asn	Thr	Asn	Asp	Thr	Ser
65					70					75					80
Asp	Ile	Ser	Ala	Asn	Thr	Asn	Ser	Ala	Asn	Val	Asp	Ser	Thr	Ala	Lys
			85					90					95		
Pro	Met	Ser	Thr	Gln	Thr	Ser	Asn	Thr	Thr	Thr	Thr	Glu	Pro	Ala	Ser
		100					105					110			
Thr	Asn	Glu	Thr	Pro	Gln	Pro	Thr	Ala	Ile	Lys	Asp	Gln	Ala	Thr	Ala
	115					120					125				
Ala	Lys	Met	Gln	Asp	Arg	Thr	Val	Pro	Gln	Glu	Ala	Asn	Ser	Gln	Val
130					135					140					
Asp	Asn	Lys	Thr	Thr	Asn	Asp	Ala	Asn	Ser	Ile	Thr	Thr	Asn	Ser	Glu
145				150					155					160	
Leu	Lys	Asn	Pro	Gln	Thr	Leu	Asp	Leu	Pro	Gln	Ser	Ser	Pro	Gln	Thr
			165					170					175		
Ile	Ser	Asn	Ala	Gln	Gly	Thr	Ser	Lys	Pro	Ser	Val	Arg	Thr	Arg	Ala
		180					185					190			
Val	Arg	Ser	Leu	Ala	Val	Ala	Glu	Pro	Val	Val	Asn	Ala	Ala	Asp	Ala
	195					200					205				
Lys	Gly	Thr	Asn	Val	Asn	Asp	Lys	Val	Thr	Ala	Lys	Asp	Phe	Gln	Leu
210					215					220					

Glu Lys Thr Thr Phe Asp Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Phe Met Ala
225 230 235 240
Ala Asn Phe Thr Val Thr Gly Gln Val Lys Ser Gly Asp Tyr Phe Thr
245 250 255
Ala Lys Leu Pro Glu Ser Leu Thr Gly Asn Gly Asp Val Asp Tyr Ser
260 265 270
Asn Ser Asn Asn Thr Met Pro Ile Ala Asp Ile Lys Ser Thr Asn Gly
275 280 285
Asn Val Val Ala Lys Ala Thr Tyr Asp Ile Leu Thr Lys Thr Tyr Thr
290 295 300
Phe Val Phe Thr Asp Tyr Val Asn Asp Lys Glu Asn Ile Asn Gly Gln
305 310 315 320
Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys Ser Gly
325 330 335
Thr Tyr Asp Ala Asn Ile Asn Ile Ala Asp Glu Met Phe Asn Asn Lys
340 345 350
Ile Thr Tyr Asn Tyr Ser Ser Pro Ile Ala Gly Ile Asp Lys Pro Asn
355 360 365
Gly Ala Asn Ile Ser Ser Gln Ile Ile Gly Val Asp Thr Ala Ser Gly
370 375 380
Gln Asn Thr Tyr Lys Gln Thr Val Phe Val Asn Pro Lys Gln Arg Val
385 390 395 400
Leu Gly Asn Thr Trp Val Tyr Ile Lys Gly Tyr Gln Asp Lys Ile Glu
405 410 415
Glu Ser Ser Gly Lys Val Ser Ala Thr Asp Thr Lys Leu Arg Ile Phe
420 425 430
Glu Val Asn Asp Thr Ser Lys Leu Ser Asp Ser Tyr Tyr Ala Asp Pro
435 440 445
Asn Asp Ser Asn Leu Lys Glu Val Thr Asp Gln Phe Lys Asp Lys Ile
450 455 460
Thr Tyr Lys Tyr Gln Asn Val Ala Ser Ile Asn Phe Gly Asp Ile Thr
465 470 475 480
Lys Thr Tyr Val Val Leu Val Glu Gly His Tyr Asp Asn Thr Gly Lys
485 490 495
Asn Leu Lys Thr Gln Val Ile Gln Glu Asn Ile Asp Pro Ala Thr Gly
500 505 510
Lys Asp Tyr Ser Ile Phe Gly Trp Asn Asn Glu Asn Val Val Arg Tyr
515 520 525
Gly Gly Gly Ser Ala Asp Gly Asp Ser Ala Val Asn
530 535 540

<210> 25
<211> 1626
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 25

ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aagcagaata agtattcgat tagacgtttt 60
acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaactatac tatttgggat aggcaatcat 120
caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacgcaat cttcgaaaaa taatgcaagt 180
gcagattccg aaaaaaacaa tatgatagaa acacctcaat taaatacaac ggctaatgat 240
acatctgata ttagtgcaaa cacaaacagt gcgaatgtag atagcacaac aaaaccaatg 300
tctacacaaa cgagcaatac cactacaaca gagccagctt caacaaatga aacacctcaa 360
ccgacggcaa ttaaaaatca agcaactgct gcaaaaatgc aagatcaaac tgttcctcaa 420
gaagcaaatt ctcaagtaga taataaaaca acgaatgatg ctaatagcat agcaacaaac 480
agtgagctta aaaattctca aacattagat ttaccacaat catcaccaca aacgatttcc 540
aatgcgcaag gaactagtaa accaagtgtt agaacgagag ctgtacgtag tttagctgtt 600
gctgaaccgg tagtaaatgc tgctgatgct aaaggtacaa atgtaaatga taaagttacg 660
gcaagtaatt tcaagttaga aaagactaca tttgacccta atcaaagtgg taacacattt 720
atggcggcaa attttacagt gacagataaa gtgaaatcag gggattattt tacagcgaag 780
ttaccagata gtttaactgg taatggagac gtggattatt ctaattcaaa taatacgatg 840
ccaattgcag acattaaaag tacgaatggc gatgttgtag ctaaagcaac atatgatatc 900
ttgactaaga cgtatacatt tgtctttaca gattatgtaa ataataaaga aaatattaac 960

ggacaatttt cattacctttt atttacagac cgagcaaagg cacctaaatc aggaacatat 1020
gatgcgaata ttaatattgc ggatgaaatg tttaataata aaattactta taactatagt 1080
tcgccaattg caggaattga taaaccaaat ggcgcgaaca tttcttctca aattattggt 1140
gtagatacag cttcaggtca aaacacatac aagcaaacag tatttgttaa ccctaagcaa 1200
cgagttttag gtaatacgtg ggtgtatatt aaaggctacc aagataaaat cgaagaaagt 1260
agcggtaaag taagtgctac agatacaaaa ctgagaattt ttgaagtgaa tgatacatct 1320
aaattatcag atagctacta tgcagatcca aatgactcta accttaaaga agtaacagac 1380
caatttaaaa atagaatcta ttatgagcat ccaaatgtag ctagtattaa atttggtgat 1440
attactaaaa catatgtagt attagtagaa gggcattacg acaatacagg taagaactta 1500
aaaactcagg ttattcaaga aaatgttgat cctgtaacaa atagagacta cagtattttc 1560
ggttggaata atgagaatgt tgtacgttat ggtggtggaa gtgctgatgg tgattcagca 1620
gtaaat 1626

<210> 26
<211> 542
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 26

Leu 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
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
145 150 155 160
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
225 230 235 240
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
305 310 315 320
Gly Gln Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
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
530 535 540

<210> 27
<211> 1626
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 27

ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aagcagaata agtattcgat tagacgtttt 60
acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaactatac tatttgggat aggcaatcat 120
caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacgcaat cttcgaaaaa taatgcaagt 180
gcagattccg aaaaaaacaa tatgatagaa acacctcaat taaatacaac ggctaatgat 240
acatctgata ttagtgcaaa cacaaacagt gcgaatgtag atagcacaac aaaaccaatg 300
tctacacaaa cgagcaatac cactacaaca gagccagctt caacaaatga aacacctcaa 360
ccgacggcaa ttaaaaatca agcaactgct gcaaaaatgc aagatcaaac tgttcctcaa 420
gaagcaaatt ctcaagtaga taataaaaca acgaatgatg ctaatagcat agcaacaaac 480
agtgagctta aaaattctca aacattagat ttaccacaat catcaccaca aacgatttcc 540
aatgcgcaag gaactagtaa accaagtgtt agaacgagag ctgtacgtag tttagctgtt 600
gctgaaccgg tagtaaatgc tgctgatgct aaaggtacaa atgtaaatga taaagttacg 660
gcaagtaatt tcaagttaga aaagactaca tttgacccta atcaaagtgg taacacattt 720
atggcggcaa attttacagt gacagataaa gtgaaatcag gggattattt tacagcgaag 780
ttaccagata gtttaactgg taatggagac gtggattatt ctaattcaaa taatacgatg 840
ccaattgcag acattaaaag tacgaatggc gatgttgtag ctaaagcaac atatgatatc 900
ttgactaaga cgtatacatt tgtctttaca gattatgtaa ataataaaga aaatattaac 960
ggacaatttt cattaccttt atttacagac cgagcaaagg cacctaaatc aggaacatat 1020
gatgcgaata ttaatattgc ggatgaaatg tttaataata aaattactta taactatagt 1080
tcgccaattg caggaattga taaaccaaat ggcgcgaaca tttcttctca aattattggt 1140
gtagatacag cttcaggtca aaacacatac aagcaaacag tatttgttaa ccctaagcaa 1200
cgagttttag gtaatacgtg ggtgtatatt aaaggctacc aagataaaat cgaagaaagt 1260
agcggtaaag taagtgctac agatacaaaa ctgagaattt ttgaagtgaa tgatatatct 1320
aaattatcag atagctacta tgcagatcca aatgactcta accttaaaga agtaacagac 1380
caatttaaaa atagaatcta ttatgagcat ccaaatgtag ctagtattaa atttggtgat 1440
attactaaaa catatgtagt attagtagaa gggcattacg acaatacagg taagaactta 1500
aaaactcagg ttattcaaga aaatgttgat cctgtaacaa atagagacta cagtattttc 1560
ggttggaata atgagaatgt tgtacgttat ggtggtggaa gtgctgatgg tgattcagca 1620
gtaaat 1626

<210> 28
<211> 542
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 28

```
Leu 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
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                 160
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                 240
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                 320
Gly Gln Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
                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 Ile 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
530 535 540

<210> 29
<211> 1626
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 29

ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aagcagaata agtattcgat tagacgtttt 60
acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaactatac tatttgggat aggcaatcat 120
caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacgcaat cttcgaaaaa taatgcaagt 180
gcagattccg aaaaaaacaa tatgatagaa acacctcaat taaatacaac ggctaatgat 240
acatctgata ttagtgcaaa cacaaacagt gcgaatgtag atagcacagc aaaaccaatg 300
tctacacaaa cgagcaatac cactacaaca gagccagctt caacaaatga aacacctcaa 360
ccgacggcaa ttaaagatca agcaactgct gcaaaaatgc aagatcaaac tgttcctcaa 420
gaagcaaatt ctcaagtaga taataaaaca acgaatgatg ctaatagcat agcgacaaac 480
agtgagctta aaaatcctca aacattagat ttaccacaat catcaccaca aacgatttcc 540
aatgcgcaaa gaactagtaa accaagtgtt agaacgagag ctgtacgtag tttagctgtt 600
gctgaaccgg tagtaaatgc tgctgatgct aaaggtacaa atgtaaatgg tcaagttacg 660
gcaagtgatt tcaagttaga aaagactaca tttgacccta accaaagtgg taacacattt 720
atggcggtaa attttaaagt ggcagggaaa gtgaaatcag gggattatta tacagcgaag 780
ttaccagata gtttaactgg taatggagac gtggattact ctaattcaaa taatacgatg 840
ccaattgcag atattaaaag tacgaatggc gatgttgtag ctaaagcaac atatgatatc 900
ttgactaaga cgtatacatt tgtctttaca gattatgtaa atgataaaga aaatattaac 960
ggacaatttt cattaccttt atttacagac cgagcaaagg cacctaaatc aggaacatac 1020
gatgcaaata ttaatattgc ggatgaaatg tttaataata aaattactta taactatagt 1080
tcgccaattg caggaattga taagccaaat ggcgcgaaca tttcttctca aattattggt 1140
gtagatacag cttcaggtca aaacacatac aagcaaacgg tatttgttaa ccctaagcaa 1200
cgagttttag gtaatacgtg ggtgtatatt aaaggttacc aagataaaat cgaagaaagt 1260
agcggtaaag taagtgctac agatacaaaa ctgagaattt ttgaagtgaa tgatacatct 1320
aaattatcag atagctacta tgcagatcca aatgactcta accttaaaga agtaacgaat 1380
gagtttaagg ataaaatcac ttataaatac caaaatgtag caagtattaa ttttggcgat 1440
attactaaaa cgtatgttgt attagtggaa ggtcactatg ataatactgg taaaaacttg 1500
aaaacacagg ttattcaaga aaatattgac ccagcgacag gtaaagacta cagtattttc 1560
ggttggaata atgagaatgt tgtacgttat ggtggtggaa gtgctgatgg tgattcagca 1620
gtaaat 1626

<210> 30
<211> 542
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 30

Leu 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
Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn Val Asp Ser Thr
85 90 95
Ala 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 Asp Gln Ala

197

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
145 150 155 160
Ser Glu Leu Lys Asn Pro Gln Thr Leu Asp Leu Pro Gln Ser Ser Pro
165 170 175
Gln Thr Ile Ser Asn Ala Gln Arg 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 Gly Gln Val Thr Ala Ser Asp Phe
210 215 220
Lys Leu Glu Lys Thr Thr Phe Asp Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Phe
225 230 235 240
Met Ala Val Asn Phe Lys Val Ala Gly Lys Val Lys Ser Gly Asp Tyr
245 250 255
Tyr 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 Asp Lys Glu Asn Ile Asn
305 310 315 320
Gly Gln Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
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 Asn Glu Phe Lys Asp
450 455 460
Lys Ile Thr Tyr Lys Tyr Gln Asn Val Ala Ser Ile Asn 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 Ile Asp Pro Ala
500 505 510
Thr Gly Lys 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
530 535 540

<210> 31
<211> 1626
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 31

ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aagcagaata agtattcgat tagacgtttt 60
acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaactatac tatttgggat aggcaatcat 120
caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacgcaat cttcgaaaaa taatgcaagt 180

gcagattccg aaaaaaacaa tatgatagaa acacctcaat taaatacaac ggctaatgat 240
acatctgata ttagtgcaaa cacaaacagt gcgaatgtag atagcacagc aaaaccaatg 300
tctacacaaa cgagcaatac cactacaaca gagccagctt caacaaatga aacacctcaa 360
ctgacggcaa ttaaagatca agcaactgct gcaaaaatgc aagatcaaac tgttcctcaa 420
gaagcaaatt ctcaagtaga taataaaaca acgaatgatg ctaatagcat agcgacaaac 480
agtgagctta aaaatcctca aacattagat ttaccacaat catcaccaca aacaatttcc 540
aatgcgcaag gaactagtaa accaagtgtt agaacgagag ctgtacgtag tcttgcagtt 600
gctgaacctg tagtaaatgc tgctgatgct aaaggtacaa atgtaaatga taaagttacg 660
gcaaaagatt ttcaattaga aaagactaca tttgacccta accaaagtgg taatactttt 720
atggcggcaa actttacagt gactggacaa gtgaaatcag gggattattt tacagcgaag 780
ttaccagata gtgtaactgg taatggagac gtggattact ctaattcgaa taatacgatg 840
ccaattgcag atatagtaaa cgataaaaat gaagttgtag caaaagcgac atatgatatt 900
ttgactaaga catatacatt tgtctttaca gattatgtaa atgataagca aaatattaat 960
gggaaatttt cattaccact atttacagac agagcaaagg cacctaaatc aggaacatat 1020
gatgcaaata ttaatattgc ggatgaaatg tttaataata aaattactta taactatagt 1080
tcgccaattg caggaattga taagccaaat ggcgcgaaca tttcttctca aattattggt 1140
gtagatacag cttcaggtca aaatacatac aagcaaacgg tatttgttaa ccctaagcaa 1200
cgagttttag gtaatacgtg ggtgtatatt aaaggttacc aagataaaat cgaagaaagt 1260
agcggtaaag taagtgctac agatacaaaa ctgagaattt ttgaagtgaa tgatacatct 1320
aaattatcag atagctacta tgcagaccca aatgactcta atcttaaaga agtaactgat 1380
caatttaagg ataaaatcac ttataaatac caaaatgtag caagtattaa ttttggtgat 1440
ataaataaaa cgtatgtcgt tttagtcgaa ggtcattatg ataaaacagg taaaaacttg 1500
aaaacgcaag tcattcaaga aaatgttgac ccagcgacag gtaaagacta cagtattttc 1560
ggttggaata atgagaatgt tgtacgttat ggtggtggaa gtgctgatgg tgattcagca 1620
gtaaat 1626

<210> 32
<211> 542
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 32

Leu 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
Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn Val Asp Ser Thr
85 90 95
Ala 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 Leu Thr Ala Ile Lys Asp 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
145 150 155 160
Ser Glu Leu Lys Asn Pro 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 Lys Asp Phe
210 215 220
Gln Leu Glu Lys Thr Thr Phe Asp Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Phe
225 230 235 240
Met Ala Ala Asn Phe Thr Val Thr Gly Gln Val Lys Ser Gly Asp Tyr

198

```
                    245                 250                 255
Phe Thr Ala Lys Leu Pro Asp Ser Val Thr Gly Asn Gly Asp Val Asp
                260                 265                 270
Tyr Ser Asn Ser Asn Asn Thr Met Pro Ile Ala Asp Ile Val Asn Asp
            275                 280                 285
Lys Asn Glu 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 Asp Lys Gln Asn Ile Asn
305                 310                 315                 320
Gly Lys Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
                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 Asp
    450                 455                 460
Lys Ile Thr Tyr Lys Tyr Gln Asn Val Ala Ser Ile Asn Phe Gly Asp
465                 470                 475                 480
Ile Asn Lys Thr Tyr Val Val Leu Val Glu Gly His Tyr Asp Lys Thr
                485                 490                 495
Gly Lys Asn Leu Lys Thr Gln Val Ile Gln Glu Asn Val Asp Pro Ala
            500                 505                 510
Thr Gly Lys 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
    530                 535                 540
<210> 33
<211> 1626
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus
<400> 33
ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aagcagaata agtattcgat tagacgtttt     60
acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaactatac tatttgggat aggcaatcat    120
caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacgcaat cttcgaaaaa taatgcaagt    180
gcagattccg aaaaaaacaa tatgatagaa acacctcaat taaatacaac ggctaatgat    240
acatctgata ttagtgcaaa cacaaacagt gcgaatgtag atagcacagc aaaaccaatg    300
tctacacaaa cgagcaatac cactacaaca gagccagctt caacaaatga aacacctcaa    360
ctgacggcaa ttaaagatca agcaactgct gcaaaaatgc aagatcaaac tgttcctcaa    420
gaagcaaatt ctcaagtaga taataaaaca acgaatgatg ctaatagcat agcgacaaac    480
agtgagctta aaaatcctca aacattagat ttaccacaat catcaccaca aacaatttcc    540
aatgcgcaag gaactagtaa accaagtgtt agaacgagag ctgtacgtag tcttgcagtt    600
gctgaacctg tagtaaatgc tgctgatgct aaaggtacaa atgtaaatga taaagttacg    660
gcaaaagatt ttcaattaga aaagactaca tttgacccta accaaagtgg taatactttt    720
atggcggcaa actttacagt gactggacaa gtgaaatcag gggattattt tacagcgaag    780
ttaccagata gtgtaactgg taatggagac gtggattact ctaattcgaa taatacgatg    840
ccaattgcag atattaaaag cacgaatggt gatgttgtag ctaaagcaac atatgatatc    900
ttgactaaga catatacatt tgtctttaca gattatgtaa atgaaaaaga aaatattaac    960
ggacaatttt cattaccttt atttacagac agagcaaagg cacctaaatc aggaacatac   1020
gatgcaaata ttaatattgc ggatgaaatg tttgataata aaattactta taactatagt   1080
tcgcctattg caggaattga taaaccaaat ggcgcaaata tttcttctca aattattggt   1140
```

gtagatacag cttcaggtca aaacacatac aagcaaacag tatttgttaa ccctaagcaa 1200
cgagttttag gtaatacgtg ggtgtatatt aaaggttacc aagataaaat cgaagaaagt 1260
agcggtaaag taagtgctac agatacaaaa ctgagaattt ttgaagtgaa tgatacatct 1320
aaattatcag atagctacta tgcggaccca aatgactcta accttaaaga agtaacgaat 1380
gaatttaagg ataaaatcac ttataaatac caaaatgtag caagtattaa ttttggcgat 1440
attactaaaa cgtatgttgt attagtggaa ggtcactatg ataatactgg taaaaacttg 1500
aaaacacagg ttattcaaga aaatattgac ccagcgacag gtaaagacta cagtattttc 1560
ggttggaata atgagaatgt tgtacgttat ggtggtggaa gtgctgatgg tgattcagca 1620
gtaaat 1626

<210> 34
<211> 542
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 34

Leu 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
Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn Val Asp Ser Thr
85 90 95
Ala 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 Leu Thr Ala Ile Lys Asp 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
145 150 155 160
Ser Glu Leu Lys Asn Pro 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 Lys Asp Phe
210 215 220
Gln Leu Glu Lys Thr Thr Phe Asp Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Phe
225 230 235 240
Met Ala Ala Asn Phe Thr Val Thr Gly Gln Val Lys Ser Gly Asp Tyr
245 250 255
Phe Thr Ala Lys Leu Pro Asp Ser Val 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 Glu Lys Glu Asn Ile Asn
305 310 315 320
Gly Gln Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
325 330 335
Ser Gly Thr Tyr Asp Ala Asn Ile Asn Ile Ala Asp Glu Met Phe Asp
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

199

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 Asn Glu Phe Lys Asp
450 455 460
Lys Ile Thr Tyr Lys Tyr Gln Asn Val Ala Ser Ile Asn 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 Ile Asp Pro Ala
500 505 510
Thr Gly Lys 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
530 535 540

<210> 35
<211> 1626
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 35

ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aagcagaata agtattcgat tagacgtttt 60
acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaactatac tatttgggat aggcaatcat 120
caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacgcaat cttcgaaaaa taatgcaagt 180
gcagattccg aaaaaaataa tatgatagaa acaccttcaat taaatacaac ggctaatgat 240
acatctgata ttagtgcaaa cacaaacagt gcgaatgtag atagcacagc aaaaccaatg 300
tctacacaaa cgagcaatac cactacaaca gagccagctt caacaaatga aacacctcaa 360
ccgacggcaa ttaaagatca agcaactgct gcaaaaatgc aagatcaaac tgttcctcaa 420
gaagcaaatt ctcaagtaga taataaaaca acgaatgatg ctaatagcat agcaacaaac 480
agtgaactta aaaatcctca aacattagat ttaccgcaat catcaccaca aacgatttcc 540
aatgcgcaag gaactagtaa accaagtgtt agaacgagag ctgtacgtag tcttgcagtt 600
gctgaacctg tagtaaatgc tgctgatgct aaaggtacaa atgtaaatga taaagttacg 660
gcaagtaatc tacagttgca aaagactaca tttgacccta accaaagtgg aaatacattt 720
atggcggcaa attttacagt gacagataaa gtgaaatcag gggattattt tacagcgaag 780
ttaccagata gtttaactgg taatggagac gtggattact ctaattcaaa taatacgatg 840
ccaattgcag atattaaaag tacgaatggc gatgttgtag ctaaagcaac atatgatatc 900
ttgactaaga cgtatacatt tgtctttaca gattatgtaa atgataaaga aaatattaac 960
gggcaatttt cattaccttt atttacagac cgagcaaagg cacctaaatc aggaacatat 1020
gatgcaaata ttaatattgc ggatgaaatg tttaataata aaattactta taactatagt 1080
tcgccaattg caggaattga taagccaaat ggcgcgaaca tttcttctca aattattggt 1140
gtagatacag cttcaggtca aaacacatac aagcaaacgg tatttgttaa ccctaagcaa 1200
cgagttttag gtaatacgtg ggtgtatatt aaaggttacc aagataaaat cgaagaaagt 1260
agcggtaaag taagtgctac agatacaaaa ctgagaattt ttgaagtgaa tgatacatct 1320
aaattatcag atagctacta tgcagaccca aatgactcta accttaaaga agtaactgat 1380
caatttaagg ataaaatcac ttataaatac caaaacgtag caagtattaa ttttggtgat 1440
ataaataaaa cgtatgtcgt tttagttgaa ggtcactatg ataatactgg aaaaaacttg 1500
aaaacacagg ttattcaaga aaatattgac ccagcgacag gtaaagacta cagtattttc 1560
ggatggaata atgagaatgt tgtacgttat ggtggtggaa gtgctgatgg tgattcagca 1620
gtaaat 1626

<210> 36
<211> 542
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 36

Leu 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
Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn Val Asp Ser Thr
85 90 95
Ala 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 Asp 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
145 150 155 160
Ser Glu Leu Lys Asn Pro 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 Leu
210 215 220
Gln Leu Gln Lys Thr Thr Phe Asp Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Phe
225 230 235 240
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 Asp Lys Glu Asn Ile Asn
305 310 315 320
Gly Gln Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
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 Asp
450 455 460
Lys Ile Thr Tyr Lys Tyr Gln Asn Val Ala Ser Ile Asn Phe Gly Asp
465 470 475 480
Ile Asn 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 Ile Asp Pro Ala

700

500 505 510
Thr Gly Lys 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
530 535 540
<210> 37
<211> 1626
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 37
ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aagcagaata agtattcgat tagacgtttt 60
acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaactatac tatttgggat aggcaatcat 120
caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacgcaat cttcgaaaaa taatgcaagt 180
gcagattccg aaaaaaacaa tatgatagaa acacctcaat taaatacaac ggctaatgat 240
acatctgata ttagtgcaaa cacaaacagt gcgaatgtag atagcacaac aaaaccaatg 300
tctacacaaa cgagcaatac cactacaaca gagccagctt caacaaatga aacacctcaa 360
ccgacggcaa ttaaagatca agcaactgct gcaaaaatgc aagatcaaac tgttcctcaa 420
gaagcaaatt ctcaagtaga taataaaaca acgaatgatg ctaatagcat agcgacaaac 480
agtgagctta aaaatcctca aacattagat ttaccacaat catcaccaca aacaatttcc 540
aatgcgcaag gaactagtaa accaagtgtt agaacgagag ctgtacgtag tcttgcagtt 600
gctgaacctg tagtaaatgc tgctgatgct aaaggtacaa atgtaaatga taaagttacg 660
gcaaaagatt ttcaattaga aaagactaca tttgacccta accaaagtgg taatactttt 720
atggcggcaa actttacagt gactggacaa gtgaaatcag gggattattt tacagcgaag 780
ttaccagata gtgtaactgg taatggagac gtggattact ctaattcgaa taatacgatg 840
ccaattgcag atattaaaag cacgaatggt gatgttgtag ctaaagcaac atatgatatc 900
ttgactaaga catatacatt tgtctttaca gattatgtaa atgaaaaaga aaatattaac 960
ggacaatttt cattaccttt atttacagac agagcaaagg cacctaaatc aggaacatac 1020
gatgcaaata ttaatattgc ggatgaaatg tttgataata aaattactta taactatagt 1080
tcgcctattg caggaattga taaaccaaat ggcgcaaata tttcttctca aattattggt 1140
gtagatacag cttcaggtca aaacacatac aagcaaacag tatttgttaa ccctaagcaa 1200
cgagttttag gtaatacgtg ggtgtatatt aaaggttacc aagataaaat cgaagaaagt 1260
agcggtaaag taagtgctac agatacaaaa ctgagaattt ttgaagtgaa tgatacatct 1320
aaattatcag atagctacta tgcggaccca aatgactcta accttaaaga agtaacgaat 1380
gaatttaagg ataaaatcac ttataaatac caaaatgtag caagtattaa ttttggcgat 1440
attactaaaa cgtatgttgt attagtggaa ggtcactatg ataatactgg taaaaacttg 1500
aaaacacagg ttattcaaga aaatattgac ccagcgacag gtaaagacta cagtattttc 1560
ggttggaata atgagaatgt tgtacgttat ggtggtggaa gtgctgatgg tgattcagca 1620
gtaaat 1626
<210> 38
<211> 542
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 38
Leu 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
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 Asp 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
145 150 155 160
Ser Glu Leu Lys Asn Pro 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 Lys Asp Phe
210 215 220
Gln Leu Glu Lys Thr Thr Phe Asp Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Phe
225 230 235 240
Met Ala Ala Asn Phe Thr Val Thr Gly Gln Val Lys Ser Gly Asp Tyr
245 250 255
Phe Thr Ala Lys Leu Pro Asp Ser Val 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 Glu Lys Glu Asn Ile Asn
305 310 315 320
Gly Gln Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
325 330 335
Ser Gly Thr Tyr Asp Ala Asn Ile Asn Ile Ala Asp Glu Met Phe Asp
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 Asn Glu Phe Lys Asp
450 455 460
Lys Ile Thr Tyr Lys Tyr Gln Asn Val Ala Ser Ile Asn 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 Ile Asp Pro Ala
500 505 510
Thr Gly Lys 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
530 535 540

<210> 39
<211> 1626
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 39

ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aagcagaata agtattcgat tagacgtttt 60
acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaactatac tatttgggat aggcaatcat 120
caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacacaat cttcgaaaaa taatgcaagt 180
gcagattccg aaaaaaacaa tatgatagaa acacctcaat taaatacaac ggctaatgat 240
acatctgata ttagtgcaaa cacaaacagt gcgaatgtag atagcacagc aaaaccaatg 300
tctacacaaa cgagcaatac cactacaaca gagccagctt caacaaatga aacacctcaa 360

201

ccgacggcaa ttaaagatca agcaactgct gcaaaaatgc aagatcaaac tgttcctcaa 420
gaagcaaatt ctcaagtaga taataaaaca acgaatgatg ctaatagcat agcaacaaac 480
agtgagctta aaaatcctca aacattagat ttaccacaat catcaccaca aacgatttcc 540
aatgcgcaag gaactagtaa accgagtgtt agaacgagag ctgtacgtag tcttgcagtt 600
gctgaacctg tagtaaatgc tgctgatgct aaaggtacaa atgtaaatgg tcaagttacg 660
gcaagtgatt tcaagttaga aaagactaca tttgacccta accaaagtgg taacacattt 720
atggcggcaa aatttacagt gactggacaa gtgaaagcag gggattattt tacagcgaag 780
ttaccagata gtgtaaatgg taatggagat gtggattact ctaattcaaa taatacgatg 840
ccaattgcag atattaaaag tacgaatggc gatgttgtag ctaaagcaac atatgatatc 900
ttgactaaga cgtatacatt tgtctttaca gattatgtaa ataataaaga aaatattaac 960
ggacaatttt cattaccttt atttacagac cgagcaaagg cacctaaatc aggaacatat 1020
gatgcgaata ttaatattgc ggatgaaatg tttaataata aaattactta taactatagt 1080
tcgccaattg caggaattga taaaccaaat ggcgcgaaca tttcttctca aattattggt 1140
gtagatacag cttcaggtca aaacacatac aagcaaacag tatatgttaa ccctaagcaa 1200
cgagttttag gtaatacgtg ggtgtatatt aaaggttacc aagataaaat cgaagaaagt 1260
agcggtaaag taagtgctac agatacaaaa ctgagaattt ttgaagtgaa tgatacatct 1320
aaattatcag atagctacta tgcagaccca aatgattcga atcttaaaga agtaacgaat 1380
gagtttaagg ataaaatcac ttataaatac caaaatgtag caagtattaa ttttggcgat 1440
attactaaaa cgtatgttgt attagtggaa ggtcactatg ataatactgg taaaaacttg 1500
aaaacacagg ttattcaaga aaatattgac ccagcgacag gtaaagacta cagtattttc 1560
ggttggaata atgagaatgt tgtacgttat ggtggtggaa gtgctgatgg tgattcagca 1620
gtaaat 1626

<210> 40
<211> 542
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 40

```
Leu 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
Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn Val Asp Ser Thr
                85                  90                  95
Ala 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 Asp 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                 160
Ser Glu Leu Lys Asn Pro 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 Gly Gln Val Thr Ala Ser Asp Phe
    210                 215                 220
Lys Leu Glu Lys Thr Thr Phe Asp Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Phe
225                 230                 235                 240
Met Ala Ala Lys Phe Thr Val Thr Gly Gln Val Lys Ala Gly Asp Tyr
                245                 250                 255
Phe Thr Ala Lys Leu Pro Asp Ser Val Asn 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
305 310 315 320
Gly Gln Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
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 Tyr 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 Asn Glu Phe Lys Asp
450 455 460
Lys Ile Thr Tyr Lys Tyr Gln Asn Val Ala Ser Ile Asn 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 Ile Asp Pro Ala
500 505 510
Thr Gly Lys 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
530 535 540

<210> 41
<211> 1626
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 41

ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aggcagaata agtattcgat tagacgtttt 60
acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaactatac tatttgggat aggcaatcat 120
caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacgcaat cttcgaaaaa taatgcaagt 180
gcagattccg aaaaaaacaa tatgatagaa acacctcaat taaatacaac ggctaatgat 240
acatctgata ttagtgcaaa cacaaacagt gcgaatgtag atagcacaac aaaaccaatg 300
tctacacaaa cgagcaatac cactacaaca gagccagctt caacaaatga aacacctcaa 360
ccgacggcaa ttaaaaatca agcaactgct gcaaaaatgc aagatcaaac tgttcctcaa 420
gaagcaaatt ctcaagtaga taataaaaca acgaatgatg ctaatagcat agcaacaaac 480
agtgagctta aaaattctca aacattagat ttaccacaat catcaccaca aacgatttcc 540
aatgcgcaag gaactagtaa accaagtgtt agaacgagag ctgtacgtag tttagctgtt 600
gctgaaccgg tagtaaatgc tgctgatgct aaaggtacaa atgtaaatga taaagttacg 660
gcaagtaatt tcaagttaga aaagactaca tttgacccta atcaaagtgg taacacattt 720
atggcggcaa attttacagt gacagataaa gtgaaatcag gggattattt tacagcgaag 780
ttaccagata gtttaactgg taatggagac gtggattatt ctaattcaaa taatacgatg 840
ccaattgcag acattaaaag tacgaatggc gatgttgtag ctaaagcaac atatgatatc 900
ttgactaaga cgtatacatt tgtctttaca gattatgtaa ataataaaga aaatattaac 960
ggacaatttt cattaccttt atttacagac cgagcaaagg cacctaaatc aggaacatat 1020
gatgcgaata ttaatattgc ggatgaaatg tttaataata aaattactta taactatagt 1080
tcgccaattg caggaattga taaaccaaat ggcgcgaaca tttcttctca aattattggt 1140
gtagatacag cttcaggtca aaacacatac aagcaaacag tatttgttaa ccctaagcaa 1200
cgagttttag gtaatacgtg ggtgtatatt aaaggctacc aagataaaat cgaagaaagt 1260
agcggtaaag taagtgctac agatacaaaa ctgagaattt ttgaagtgaa tgatacatct 1320

aaattatcag atagctacta tgcagatcca aatgactcta accttaaaga agtaacagac 1380
caatttaaaa atagaatcta ttatgagcat ccaaatgtag ctagtattaa atttggtgat 1440
attactaaaa catatgtagt attagtagaa gggcattacg acaatacagg taagaactta 1500
aaaactcagg ttattcaaga aaatgttgat cctgtaacaa atagagacta cagtattttc 1560
ggttggaata atgagaatgt tgtacgttat ggtggtggaa gtgctgatgg tgattcagca 1620
gtaaat 1626

<210> 42
<211> 542
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 42

Leu Lys Lys Arg Ile Asp Tyr Leu Ser Asn Arg 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
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
145 150 155 160
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
225 230 235 240
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
305 310 315 320
Gly Gln Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
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
530 535 540

<210> 43
<211> 1626
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 43

ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aagcagaata agtattcgat tagacgtttt 60
acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaactatac tatttgggat aggcaatcat 120
caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacgcaat cttcgaaaaa taatgcaagt 180
gcagattccg aaaaaaacaa tatgatagaa acacctcaat taaatacaac ggctaatgat 240
acatctgata ttagtgcaaa cacaaacagt gcgaatgtag atagcacaac aaaaccaatg 300
tctacacaaa cgagcaatac cactacaaca gagccagctt caacaaatga aacacctcaa 360
ccgacggcaa ttaaaaatca agcaactgct gcaaaaatgc aagatcaaac tgttcctcaa 420
gaagcaaatt ctcaagtaga taataaaaca acgaatgatg ctaatagcat agcaacaacc 480
agtgagctta aaaattctca aacattagat ttaccacaat catcaccaca aacgatttcc 540
aatgcgcaag gaactagtaa accaagtgtt agaacgagag ctgtacgtag tttagctgtt 600
gctgaaccgg tagtaaatgc tgctgatgct aaaggtacaa atgtaaatga taaagttacg 660
gcaagtaatt tcaagttaga aaagactaca tttgacccta atcaaagtgg taacacattt 720
atggcggcaa attttacagt gacagataaa gtgaaatcag gggattattt tacagcgaag 780
ttaccagata gtttaactgg taatggagac gtggattatt ctaattcaaa taatacgatg 840
ccaattgcag acattaaaag tacgaatggc gatgttgtag ctaaagcaac atatgatatc 900
ttgactaaga cgtatacatt tgtctttaca gattatgtaa ataataaaga aaatattaac 960
ggacaatttt cattaccttt atttacagac cgagcaaagg cacctaaatc aggaacatat 1020
gatgcgaata ttaatattgc ggatgaaatg tttaataata aaattactta taactatagt 1080
tcgccaattg caggaattga taaaccaaat ggcgcgaaca tttcttctca aattattggt 1140
gtagatacag cttcaggtca aaacacatac aagcaaacag tatttgttaa ccctaagcaa 1200
cgagttttag gtaatacgtg ggtgtatatt aaaggctacc aagataaaat cgaagaaagt 1260
agcggtaaag taagtgctac agatacaaaa ctgagaattt ttgaagtgaa tgatacatct 1320
aaattatcag atagctacta tgcagatcca aatgactcta accttaaaga agtaacagac 1380
caatttaaaa atagaatcta ttatgagcat ccaaatgtag ctagtattaa atttggtgat 1440
attactaaaa catatgtagt attagtagaa gggcattacg acaatacagg taagaactta 1500
aaaactcagg ttattcaaga aaatgttgat cctgtaacaa atagagacta cagtattttc 1560
ggttggaata atgagaatgt tgtacgttat ggtggtggaa gtgctgatgg tgattcagca 1620
gtaaat 1626

<210> 44
<211> 542
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 44

Leu 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
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 Thr
145                 150                 155                 160
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                 240
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                 320
Gly Gln Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
                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
530 535 540

<210> 45
<211> 1626
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 45

ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aagcagaata agtattcgat tagacgtttt 60
acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaactatac tatttgggat aggcaatcat 120
caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacgcaat cttcgaaaaa taatgcaagt 180
gcagattccg aaaaaaacaa tatgatagaa acacctcaat taaatacaac ggctaatgat 240
acatctgata ttagtgcaaa cacaaacagt gcgaatgtag atagcacagc aaaaccaatg 300
tctacacaaa cgagcaatac cactacaaca gagccagctt caacaaatga aacacctcaa 360
ccgacggcaa ttaaagatca agcaactgct gcaaaaatgc aagatcaaac tgttcctcaa 420
gaagcaaatt cttcaagtaga taataaaaca acgaatgatg ctaatagcat agcgacaaac 480
tgtgagctta aaaatcctca aacattagat ttaccacaat catcaccaca aacaatttcc 540
aatgcgcaag gaactagtaa accaagtgtt agaacgagag ctgtacgtag tcttgcagtt 600
gctgaacctg tagtaaatgc tgctgatgct aaaggtacaa atgtaaatga taaagttacg 660
gcaaaagatt ttcaattaga aaagaccaca tttgacccta accaaagtgg taatactttt 720
atggcggcaa actttacagt gactggacaa gtgaaatcag gggattattt tacagcgaag 780
ttaccagata gtgtaactgg taatggagac gtggattact ctaattcgaa taatacgatg 840
ccaattgcag atattaaaag tacgaatggc gatgttgtag ctaaagcaac atatgatatc 900
ttgactaaga cgtatacatt tgtctttaca gattatgtaa ataataaaga aaatattaac 960
ggacaatttt cattaccttt atttacagac cgagcaaagg cacctaaatc aggaacatat 1020
gatgcgaata ttaatattgc ggatgaaatg tttaataata aaattactta taactatagt 1080
tcgccaattg caggaattga taaaccaaat ggcgcgaaca tttcttctca aattattggt 1140
gtagatacag cttcaggtca aaacacatac aagcaaacag tatttgttaa ccctaagcaa 1200
cgagttttag gtaatacgtg ggtgtatatt aaaggttacc aagataaaat cgaagaaagt 1260
agcggtaaag taagtgctac agatacaaaa ctgagaattt ttgaagtgaa tgatacatct 1320
aaattatcag atagctacta tgcggaccca aatgactcta accttaaaga agtaacgaat 1380
gagtttaagg ataaaatcac ttataaatac caaaatgtag caagtattaa ttttggcgat 1440
attactaaaa cgtatgttgt attagtggaa ggtcactatg ataatactgg taaaaacttg 1500
aaaacacagg ttattcaaga aaatattgac ccagcgacag gtaaagacta cagtattttc 1560
ggttggaata atgagaatgt tgtacgttat ggtggtggaa gtgctgatgg tgattcagca 1620
gtaaat 1626

<210> 46
<211> 542
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 46

Leu 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
Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn Val Asp Ser Thr
85 90 95
Ala 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 Asp 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
145 150 155 160
Cys Glu Leu Lys Asn Pro Gln Thr Leu Asp Leu Pro Gln Ser Ser Pro

204

```
                    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 Lys Asp Phe
    210                 215                 220
Gln Leu Glu Lys Thr Thr Phe Asp Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Phe
225                 230                 235                 240
Met Ala Ala Asn Phe Thr Val Thr Gly Gln Val Lys Ser Gly Asp Tyr
                245                 250                 255
Phe Thr Ala Lys Leu Pro Asp Ser Val 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                 320
Gly Gln Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
                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 Asn Glu Phe Lys Asp
    450                 455                 460
Lys Ile Thr Tyr Lys Tyr Gln Asn Val Ala Ser Ile Asn 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 Ile Asp Pro Ala
            500                 505                 510
Thr Gly Lys 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
    530                 535                 540
<210> 47
<211> 1626
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus
<400> 47
ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aagcagaata agtattcgat tagacgtttt     60
acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaactatac tatttgggat aggcaatcat    120
caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacgcaat cttcgaaaaa taatgcaagt    180
gcagattccg aaaaaaacaa tacgatagaa acaccttcaat taaatacaac ggctaatgat    240
acatctgata ttagtgcaaa cacaaacagt gcgaatgtag atagcacagc aaaaccaatg    300
tctacacaaa cgagcaatac cactacaaca gagccagctt caacaaatga aacacctcaa    360
ccgacggcaa ttaaagatca agcaactgct gcaaaaatgc aagatcaaac tgttcctcaa    420
gaagcaaatt cttcaagtaga taataaaaca acgaatgatg ctaatagcat agcgacaaac    480
agcgagctta aaaatcctca gacattagat ttaccacaat catcaccaca aacgatttcc    540
```

aatgcgcaag gaactagtga accaagtgtt agaacgagag ctgtacgtag tcttgcagtt 600
gctgaacctg tagtaaatgc tgctgatgct aaaggtacaa atgtaaatga taaagttacg 660
gcaagtgatt tcaagttaga aaagactaca tttgacccta accaaagtgg taacacattt 720
atggcggcaa attttaaagt ggcagggaaa gtgaaatcag gggattattt tacagcgaag 780
ttaccagata gtgtaactgg taatggagac gtggattact ctaattcaaa taatacgatg 840
ccaattgcag atatagtgaa tgataaaaaa gaagttgtag ctaaagcaac atatgatatc 900
ttgactaaga cgtatacatt tgtctttaca gattatgtaa atgataaaga aaatattaac 960
ggacaatttt cattaccttt atttacagac cgagcaaagg cacctaaatc aggaacatat 1020
gatgcaaata ttaatattgc ggatgaaatg tttaacaatc aaattactta taactatagt 1080
tcaccaattg caggaattga taagccaaat ggcgcgaaca tttcttctca aattattggt 1140
gtagatacag cttcaggtca aaacacatac aagcaaacgg tatttgttaa ccctaagcaa 1200
cgagttttag gtaatacgtg ggtgtatatt aaaggttacc aagataaaat cgaagaaagt 1260
agcggtaaag taagtgctac agatacaaaa ctgagaattt ttgaagtgaa tgatacatct 1320
aaattatcag atagctacta tgcagaccca aatgactcta accttaaaga agtaactaat 1380
gagtttaagg ataaaatcac ttataaatac caaaacgtag caagtattaa ttttggtgat 1440
ataaataaaa cgtatgtcgt tttagtcgaa ggtcattatg ataatactgg taaaaacttg 1500
aaaacacagg ttattcaaga aaatattgac ccagcgacag gtaaagatta cagtattttc 1560
ggttggaata atgagaatgt tgtacgttat ggaggcggaa gtgctgatgg tgattcagca 1620
gtaaat 1626

<210> 48
<211> 542
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 48

Leu 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 Thr Ile Glu Thr Pro Gln Leu Asn Thr Thr Ala Asn Asp
65 70 75 80
Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn Val Asp Ser Thr
85 90 95
Ala 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 Asp 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
145 150 155 160
Ser Glu Leu Lys Asn Pro Gln Thr Leu Asp Leu Pro Gln Ser Ser Pro
165 170 175
Gln Thr Ile Ser Asn Ala Gln Gly Thr Ser Glu 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 Asp Phe
210 215 220
Lys Leu Glu Lys Thr Thr Phe Asp Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Phe
225 230 235 240
Met Ala Ala Asn Phe Lys Val Ala Gly Lys Val Lys Ser Gly Asp Tyr
245 250 255
Phe Thr Ala Lys Leu Pro Asp Ser Val Thr Gly Asn Gly Asp Val Asp
260 265 270
Tyr Ser Asn Ser Asn Asn Thr Met Pro Ile Ala Asp Ile Val Asn Asp
275 280 285
Lys Lys Glu 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 Asp Lys Glu Asn Ile Asn
305 310 315 320
Gly Gln Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
325 330 335
Ser Gly Thr Tyr Asp Ala Asn Ile Asn Ile Ala Asp Glu Met Phe Asn
340 345 350
Asn Gln 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 Asn Glu Phe Lys Asp
450 455 460
Lys Ile Thr Tyr Lys Tyr Gln Asn Val Ala Ser Ile Asn Phe Gly Asp
465 470 475 480
Ile Asn 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 Ile Asp Pro Ala
500 505 510
Thr Gly Lys 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
530 535 540

<210> 49
<211> 1626
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 49

ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aagcagaata agtattcgat tagacgtttt 60
acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaactatac tatttgggat aggcaatcat 120
caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacgcaat cttcgaaaaa taatgcaagt 180
gcagattccg aaaaaaacaa tatgatagaa acaccttcaat taaatacaac ggctaatgat 240
acatctgata ttagtgcaaa cacaaacagt gcgaatgtag atagcacagc aaaaccaatg 300
tctacacaaa cgagcaatac cactacaaca gagccagctt caacaaatga aacacctcaa 360
ccgacggcaa ttaaagatca agcaactgct gcaaaaatgc aagatcaaac tgttcctcaa 420
gaagcaaatt ctcaagtaga taataaaaca acgaatgatg ctaatagcat agcgacaaac 480
agtgagctta aaaatcctca aacattagat ttaccacaat catcaccaca aacgatttcc 540
aatgcgcaaa gaactagtaa accaagtgtt agaaccagag ctgtacgtag tttagctgtt 600
gctgaaccgg tagtaaatgc tgctgatgct aaaggtacaa atgtaaatga taaagttacg 660
gcaagtaatc tacagttgca aaagactacg tttgacccta accaaagtgg taacacattt 720
atggcggcaa attttacagt gacagataaa gtgaaatcag gagattattt tacagcgaag 780
ttaccagata gtttaactgg taatggagac gtggattact ctaattcaaa taatacgatg 840
ccaattgcag atattaaaag tacgaatggc gatgttgtag ctaaagcaac atatgatatc 900
ttgactaaga cgtatacatt tgtctttaca gattatgtaa atgataaaga aaatattaac 960
ggacaatttt cattaccttt atttacagac cgagcaaagg cacctaaatc aggaacatac 1020
gatgcaaata ttaatattgc ggatgaaatg tttaataata aaattactta taactatagt 1080
tcgccaattg caggaattga taagccaaat ggcgcgaaca tttcttctca gattattggt 1140
gtagatacag cttcaggtca aaacacatac aagcaaacgg tatttgttaa ccctaagcaa 1200
cgagttttag gtaatacgtg ggtgtatatt aaaggctacc aagataaaat cgaagaaagt 1260
agcggtaaag taagtgctaa agatacaaaa ctgagaattt ttgaagtgaa tgatacatct 1320
aaattatcag atagctacta tgcagaccca aatgattcga atcttaaaga agtaacagac 1380
caatttaaaa atagaatcta ttatgagcat ccaaatgtag ctagtattaa ttttggcgat 1440
attactaaaa cgtatgttgt attagtggaa ggtcactatg ataatactgg taaaaacttg 1500

aaaacacagg ttattcaaga aaatattgac ccagcgacag gtaaagacta cagtattttc 1560
ggttggaata atgagaatgt tgtacgttat ggtggtggaa gtgctgatgg tgattcagca 1620
gtaaat 1626

<210> 50
<211> 542
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 50

```
Leu 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
Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn Val Asp Ser Thr
                85                  90                  95
Ala 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 Asp 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                 160
Ser Glu Leu Lys Asn Pro Gln Thr Leu Asp Leu Pro Gln Ser Ser Pro
                165                 170                 175
Gln Thr Ile Ser Asn Ala Gln Arg 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 Leu
    210                 215                 220
Gln Leu Gln Lys Thr Thr Phe Asp Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Phe
225                 230                 235                 240
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 Asp Lys Glu Asn Ile Asn
305                 310                 315                 320
Gly Gln Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
                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 Lys 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 Asn 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 Ile Asp Pro Ala
500 505 510
Thr Gly Lys 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
530 535 540

<210> 51
<211> 1626
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 51

ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aagcagaata agtattcgat tagacgtttt 60
acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaactatac tatttgggat aggcaatcat 120
caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacgcaat cttcgaaaaa taatgcaagt 180
gcagattccg aaaaaaacaa tatgatagaa acacctcaat taaatacaac ggctaatgat 240
acatctgata ttagtgcaaa cacaaacagt gcgaatgtag atagcacagc aaaaccaatg 300
tctacacaaa cgagcaatac cactacaaca gagccagctt caacaaatga aacacctcaa 360
ccgacggcaa ttaaagatca agcaactgct gcaaaaatgc aagatcaaac tgttcctcaa 420
gaagcaaatt ctcaagtaga taataaaaca acgaatgatg ctaataacat agcaacaaac 480
agtgggctta aaaatcctca aacattagat ttaccacaat catcaccaca aacgatttcc 540
aatgcgcaag gaactagtaa accaagtgtt agaacgagag ctgtacgtag tcttgcagtt 600
gctgaacctg tagtaaatgc tgctgatgct aaaggtacaa atgtaaatga taaagttacg 660
gcaagtgatt tcaagttaga aaagactaca ttcgacccta accaaagtgg taacacattt 720
atggcggcaa attttacagt gacagataaa gtgaaatcag gggattattt tacagcgaag 780
ttaccagata gtttaactgg taatggagac gtggattact ctaattcaaa taatacgatg 840
ccaattgcag acattaaaag tacgaatggt gatgttgtag cgacagcgac ttataatatc 900
ttgactaaga cgtatacatt tgtctttaca gattatgtaa atgataaaga aaatattaac 960
ggacaatttt cattaccttt atttacagac cgagcaaagg cacctaaatc aggaacatat 1020
gatgcaaata ttaatattgc ggatgaaatg tttaataata aaattactta taactatagt 1080
tcgccaattg caggaattga taagccaaat ggcgcgaaca tttcttctca aattattggt 1140
gtagatacag cttcaggcca aaacacatac aagcaaacgg tatttgttaa ccctaagcaa 1200
cgagttttag gtaatacgtg ggtgtatatt aaaggctacc aagataaaat cgaagaaagt 1260
agcggtaaag taagtgctac agatacaaaa ctgagaattt ttgaagtgaa tgatacatct 1320
aaattatcag atagctacta tgcggaccca aatgactcta atcttaaaga agtaacgaat 1380
gagtttaagg ataaaatcac ttataaatac caaaatgtag caagtattaa ttttggcgat 1440
attactaaaa cgtatgttgt attagtggaa ggtcactatg ataatactgg taaaaacttg 1500
aaaacacagg ttattcaaga aaatattgac ccagcgacag gtaaagatta cagtattttc 1560
ggttggaata atgagaatgt tgtacgttat ggaggcggaa gtgctgatgg tgattcagca 1620
gtaaat 1626

<210> 52
<211> 542
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 52

Leu 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
Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn Val Asp Ser Thr
85 90 95
Ala 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 Asp 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 Asn Ile Ala Thr Asn
145 150 155 160
Ser Gly Leu Lys Asn Pro 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 Asp Phe
210 215 220
Lys Leu Glu Lys Thr Thr Phe Asp Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Phe
225 230 235 240
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 Thr Ala Thr Tyr Asn Ile Leu Thr Lys Thr
290 295 300
Tyr Thr Phe Val Phe Thr Asp Tyr Val Asn Asp Lys Glu Asn Ile Asn
305 310 315 320
Gly Gln Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
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 Asn Glu Phe Lys Asp
450 455 460
Lys Ile Thr Tyr Lys Tyr Gln Asn Val Ala Ser Ile Asn 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 Ile Asp Pro Ala
500 505 510
Thr Gly Lys 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
530 535 540

<210> 53

<211> 1626
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 53

ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aagcagaata agtattcgat tagacgtttt 60
acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaactatac tatttgggat aggcaatcat 120
caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacgcaat cttcgaaaaa taatgcaagt 180
gcagattccg aaaaaaacaa tatgatagaa acacctcaat taaatacaac ggctaatgat 240
acatctgata ttagtgcaaa cacaaacagt gcgaatgtag atagcacagc aaaaccaatg 300
tctacacaaa cgagcaatac cactacaaca gagccagctt caacaaatga aacaccttcaa 360
ccgacggcaa ttaaagatca agcaactgct gcaaaaatgc aagatcaaac tgttcctcaa 420
gaagcaaatt ctcaagtaga taataaaaca acgaatgatg ctaataacat agcaacaaac 480
agtgagctta aaaatcctca aacattagat ttaccacaat catcaccaca aacgatttcc 540
aatgcgcaag gaactagtaa accaagtgtt agaacgagag ctgtacgtag tcttgcagtt 600
gctgaacctg tagtaaatgc tgctgatgct aaaggtacaa atgtaaatga taaagttacg 660
gcaagtgatt tcaagttaga aaagactaca ttcgacccta accaaagtgg taacacattt 720
atggcggcaa attttacagt gacagataaa gtgaaatcag gggattattt tacagcgaag 780
ttaccagata gtttaactgg taatggagac gtggattact ctaattcaaa taatacgatg 840
ccaattgcag acattaaaag tacgaatggt gatgttgtag cgacagcgac ttataatatc 900
ttgactaaga cgtatacatt tgtctttaca gattatgtaa atgataaaga aaatattaac 960
ggacaatttt cattaccttt atttacagac cgagcaaagg cacctaaatc aggaacatat 1020
gatgcaaata ttaatattgc ggatgaaatg tttaataata aaattactta taactatagt 1080
tcgccaattg caggaattga taagccaaat ggcgcgaaca tttcttctca aattattggt 1140
gtagatacag cttcaggcca aaacacatac aagcaaacgg tatttgttaa ccctaagcaa 1200
cgagttttag gtaatacgtg ggtgtatatt aaaggctacc aagataaaat cgaagaaagt 1260
agcggtaaag taagtgctac agatacaaaa ctgagaattt ttgaagtgaa tgatacatct 1320
aaattatcag atagctacta tgcggaccca aatgaatcta atcttaaaga agtaacgaat 1380
gagtttaagg ataaaatcac ttataaatac caaaatgtag caagtattaa ttttggcgat 1440
attactaaaa cgtatgttgt attagtggaa ggtcactatg ataatactgg taaaaacttg 1500
aaaacacagg ttattcaaga aaatattgac ccagcgacag gtaaagatta cagtattttc 1560
ggttggaata atgagaatgt tgtacgttat ggaggcggaa gtgctgatgg tgattcagca 1620
gtaaat 1626

<210> 54
<211> 542
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 54

Leu 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
Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn Val Asp Ser Thr
85 90 95
Ala 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 Asp 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 Asn Ile Ala Thr Asn
145 150 155 160
Ser Glu Leu Lys Asn Pro 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 Asp Phe
210 215 220
Lys Leu Glu Lys Thr Thr Phe Asp Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Phe
225 230 235 240
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 Thr Ala Thr Tyr Asn Ile Leu Thr Lys Thr
290 295 300
Tyr Thr Phe Val Phe Thr Asp Tyr Val Asn Asp Lys Glu Asn Ile Asn
305 310 315 320
Gly Gln Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
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 Asn Glu Phe Lys Asp
450 455 460
Lys Ile Thr Tyr Lys Tyr Gln Asn Val Ala Ser Ile Asn 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 Ile Asp Pro Ala
500 505 510
Thr Gly Lys 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
530 535 540

<210> 55
<211> 1626
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 55

ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aagcagaata agtattcgat tagacgtttt 60
acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaactatac tatttgggat aggcaatcat 120
caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacgcaat cttcgaaaaa taatgcaagt 180
gcagattccg aaaaaaacaa tatgatagaa acacctcaat taaatacaac ggctaatgat 240
acatctgata ttagtgcaaa cacaaacagt gcgaatgtag atagcacagc aaaaccaatg 300
tctacacaaa cgagcaatac cactacaaca gagccagctt caacaaatga aacacctcaa 360
ccgacggcaa ttaaagatca agcaactgct gcaaaaatgc aagatcaaac tgttcctcaa 420
gaagcaaatt ctcaagtaga taataaaaca acgaatgatg ctaatagcat agcgacaaac 480
agtgagctta aaaatcctca aacattagat ttaccacaat catcaccaca aacaatttcc 540
aatgcgcaag gaactagtaa accaagtgtt agaacgagag ctgtacgtag tcttgcagtt 600
gctgaacctg tagtaaatgc tgctgatgct aaaggtacaa atgtaaatga taaagttacg 660
gcaaaagatt ttcaattaga aaagaccaca tttgacccta accaaagtgg taatactttt 720

atggcggcaa actttacagt gactggacaa gtgaaatcag gggattattt tacagcgaag 780
ttaccagata gtgtaactgg taatggagac gtggattact ctaattcgaa taatacgatg 840
ccaattgcag atattaaaag tacgaatggc gatgttgtag ctaaagcaac atatgatatc 900
ttgactaaga cgtatacatt tgtctttaca gattatgtaa ataataaaga aaatattaac 960
ggacaatttt cattaccttt atttacagac cgagcaaagg cacctaaatc aggaacatat 1020
gatgcgaata ttaatattgc ggatgaaatg tttaataata aaattactta taactatagt 1080
tcgccaattg caggaattga taaaccaaat ggcgcgaaca tttcttctca aattattggt 1140
gtagatacag cttcaggtca aaacacatac aagcaaacag tatttgttaa ccctaagcaa 1200
cgagttttag gtaatacgtg ggtgtatatt aaaggttacc aagataaaat cgaagaaagt 1260
agcggtaaag taagtgctac agatacaaaa ctgagaattt ttgaagtgaa tgatacatct 1320
aaattatcag atagctacta tgcggaccca aatgactcta accttaaaga agtaacgaat 1380
gagtttaagg ataaaatcac ttataaatac caaaatgtag caagtattaa ttttggcgat 1440
attactaaaa cgtatgttgt attagtggaa ggtcactatg ataatactgg taaaaacttg 1500
aaaacacagg ttattcaaga aaatattgac ccagcgacag gtaaagacta cagtattttc 1560
ggttggaata atgagaatgt tgtacgttat ggtggtggaa gtgctgatgg tgattcagca 1620
gtaaat 1626

<210> 56
<211> 542
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 56

Leu 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
Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn Val Asp Ser Thr
85 90 95
Ala 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 Asp 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
145 150 155 160
Ser Glu Leu Lys Asn Pro 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 Lys Asp Phe
210 215 220
Gln Leu Glu Lys Thr Thr Phe Asp Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Phe
225 230 235 240
Met Ala Ala Asn Phe Thr Val Thr Gly Gln Val Lys Ser Gly Asp Tyr
245 250 255
Phe Thr Ala Lys Leu Pro Asp Ser Val 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
305 310 315 320

Gly Gln Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
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 Asn Glu Phe Lys Asp
450 455 460
Lys Ile Thr Tyr Lys Tyr Gln Asn Val Ala Ser Ile Asn 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 Ile Asp Pro Ala
500 505 510
Thr Gly Lys 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
530 535 540

<210> 57
<211> 1626
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 57

ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aagcagaata agtattcgat tagacgtttt 60
acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaactatac tatttgggat aggcaatcat 120
caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacgcaat cttcgaaaaa taatgcaagt 180
gcagattccg aaaaaaacaa tacgatagaa acacctcaat taaatacaac ggctaatgat 240
acatctgata ttagtgcaaa cacaaacagt gcgaatgtag atagcacagc aaaaacaatg 300
tctacacaaa cgagcaatac cactacaaca gagccagctt caacaaatga aacacctcaa 360
ccgacggcaa ttaaagatca agcaactgct gcaaaaatgc aagatcaaac tgttcctcaa 420
gaagcaaatt ctcaagtaga taataaaaca acgaatgatg ctaataacat agcaacaaac 480
agtgagctta aaaatcctca aacattagat ttaccacaat catcaccaca aacgatttcc 540
aatgcgcaag gaactagtaa accaagtgtt agaacgagag ctgtacgtag tcttgcagtt 600
gctgaacctg tagtaaatgc tgctgatgct aaaggtacaa atgtaaatga taaagttacg 660
gcaagtgatc tcaagttaga aaagactgca tttgacccta accaaagtgg taacacattt 720
atggcggcaa attttaaagt gactggacaa gtgaaatcag gggattattt tacagcgaag 780
ttaccagata gtgtaactgg taatggagac gtggattact ctaattcaaa taatacgatg 840
ccaattgcag acattaaaag tacgaatggc gatgttgtag ctaaagcaac atatgatatc 900
ttgactaaga cgtatacatt tgtctttaca gattatgtaa atgataaaga aaatattaac 960
ggacaatttt cattaccttt atttacagac cgagcaaagg cacctaaatc aggaacatat 1020
gatgcaaata ttaatattgc ggatgaaatg tttgataata aaattactta taactatagt 1080
tcgccaattg caggaattga taagccaaat ggcgcgaaca tttcttctca aattattggt 1140
gtagatacag cttcaggtca aaacacatac aagcaaacgg tatttgttaa ccctaagcaa 1200
cgagttttag gtaatacgtg ggtgtatatt aaaggttacc aagataaaat cgaagaaagt 1260
agcggtaaag taagtgctac agatacaaaa ctgagaattt ttgaagtgaa tgatacatct 1320
aaattatcag atagctacta tgcagaccca aatgactcta accttaaaga agtgactggt 1380
gagtttaaag ataaaatttc atacaaatac gataacgtag caagtattaa ttttggtgat 1440
ataaataaaa cgtatgttgt attagtggaa ggtcactatg ataatactgg taaaaacttg 1500
aaaacacagg ttattcaaga aaatattgac tcagcgacag gtaaagacta cagtattttc 1560
ggttggaata atgagaatgt tgtacgttat ggaggcggaa gtgctgatgg tgattcagca 1620
gtaaat 1626

209

<210> 58
<211> 542
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 58

```
Leu 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 Thr Ile Glu Thr Pro Gln Leu Asn Thr Thr Ala Asn Asp
65                  70                  75                  80
Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn Val Asp Ser Thr
                85                  90                  95
Ala Lys Thr 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 Asp 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 Asn Ile Ala Thr Asn
145                 150                 155                 160
Ser Glu Leu Lys Asn Pro 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 Asp Leu
    210                 215                 220
Lys Leu Glu Lys Thr Ala Phe Asp Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Phe
225                 230                 235                 240
Met Ala Ala Asn Phe Lys Val Thr Gly Gln Val Lys Ser Gly Asp Tyr
                245                 250                 255
Phe Thr Ala Lys Leu Pro Asp Ser Val 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 Asp Lys Glu Asn Ile Asn
305                 310                 315                 320
Gly Gln Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
                325                 330                 335
Ser Gly Thr Tyr Asp Ala Asn Ile Asn Ile Ala Asp Glu Met Phe Asp
            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 Gly Glu Phe Lys Asp
450 455 460
Lys Ile Ser Tyr Lys Tyr Asp Asn Val Ala Ser Ile Asn Phe Gly Asp
465 470 475 480
Ile Asn 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 Ile Asp Ser Ala
500 505 510
Thr Gly Lys 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
530 535 540

<210> 59
<211> 1626
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 59

ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aagcagaata agtattcgat tagacgtttt 60
acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaactatac tatttgggat aggcaatcat 120
caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacgcaat cttcgaaaaa taatgcaagt 180
gcagattccg aaaaaaacaa tatgatagaa acacctcaat taaatacaac ggctaatgat 240
acatctgata ttagtgcaaa cacaaacagt gcgaatgtag atagcacaac aaaaccaatg 300
tctacacaaa cgagcaatac cactacaaca gagccagctt caacaaatga aacacctcaa 360
ccgacggcaa ttaaaaatca agcaactgct gcaaaaatgc aagatcaaac tgttcctcaa 420
gaagcaaatt ctcaagtaga taataaaaca acgaatgatg ctaatagcat agcaacaaac 480
agtgagctta aaaattctca aacattagat ttaccacaat catcaccaca aacgatttcc 540
aatgcgcaag gaactagtaa accaagtgtt agaacgagag ctgtacgtag tttagctgtt 600
gctgaaccgg tagtaaatgc tgctgatgct aaagatacaa atgtaaatga taaagttacg 660
gcaagtaatt tcaagttaga aaagactaca tttgacccta atcaaagtgg taacacattt 720
atggcggcaa attttacagt gacagataaa gtgaaatcag gggattattt tacagcgaag 780
ttaccagata gtttaactgg taatggagac gtggattatt ctaattcaaa taatacgatg 840
ccaattgcag acattaaaag tacgaatggc gatgttgtag ctaaagcaac atatgatatc 900
ttgactaaga cgtatacatt tgtctttaca gattatgtaa ataataaaga aaatattaac 960
ggacaatttt cattaccttt atttacagac cgagcaaagg cacctaaatc aggaacatat 1020
gatgcgaata ttaatattgc ggatgaaatg tttaataata aaattactta taactatagt 1080
tcgccaattg caggaattga taaaccaaat ggcgcgaaca tttcttctca aattattggt 1140
gtagatacag cttcaggtca aaacacatac aagcaaacag tatttgttaa ccctaagcaa 1200
cgagttttag gtaatacgtg ggtgtatatt aaaggctacc aagataaaat cgaagaaagt 1260
agcggtaaag taagtgctac agatacaaaa ctgagaattt ttgaagtgaa tgatacatct 1320
aaattatcag atagctacta tgcagatcca aatgactcta accttaaaga agtaacagac 1380
caatttaaaa atagaatcta ttatgagcat ccaaatgtag ctagtattaa atttggtgat 1440
attactaaaa catatgtagt attagtagaa gggcattacg acaatacagg taagaactta 1500
aaaactcagg ttattcaaga aaatgttgat cctgtaacaa atagagacta cagtatttc 1560
ggttggaata atgagaatgt tgtacgttat ggtggtggaa gtgctgatgg tgattcagca 1620
gtaaat 1626

<210> 60
<211> 542
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 60

Leu 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
Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn Val Asp Ser Thr

210

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
145 150 155 160
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 Asp 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
225 230 235 240
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
305 310 315 320
Gly Gln Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
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
530 535 540

<210> 61
<211> 1677
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 61
atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60
gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120
gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180
agcgttagtg ctgcacctaa aacagacgac acaaacgtga gtgatactaa aacatcgtca 240
aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300
tcatcatcaa caaatgcaac tacggaagaa acgccggtaa ctggtgaagc tactactacg 360
acaacgaatc aagctaatac accggcaaca actcaatcaa gcaatacaaa tgcggaggaa 420
ttagtgaatc aaacaagtaa tgaaacgact tctaatgata ctaatacagt atcatctgta 480
aattcacctc aaaatttctac aaatgcggaa aatgtttcaa caacgcaaga tacttcaact 540
gaagcaacac cttcaaacaa tgaatcagct ccacagagta cagatgcaag taataaagat 600
gtagttaatc aagcggttaa tacaagtgcg cctagaatga gagcatttag tttagcggca 660
gtagctgcag atgcaccggc agctggcaca gatattacga atcagttgac gaatgtgaca 720
gttggtattg actctggtac gactgtgtat ccgcaccaag caggttatgt caaactgaat 780
tatggttttt cagtgcctaa ttctgctgtt aaaggtgaca cattcaaaat aactgtacct 840
aaagaattaa acttaaatgg tgtaacttca actgctaaag tgccaccaat tatggctgga 900
gatcaagtat tggcaaatgg tgtaatcgat agtgatggta atgttattta tacatttaca 960
gactatgtaa atactaaaga tgatgtaaaa gcaactttga ccatgcccgc ttatattgac 1020
cctgaaaatg ttaaaaagac aggtaatgtg acattggcta ctggcatagg tagtacaaca 1080
gcaaacaaaa cagtattagt agattatgaa aaatatggta agttttataa cttatctatt 1140
aaaggtacaa ttgaccaaat cgataaaaca aataatacgt atcgtcagac aatttatgtc 1200
aatccaagtg gagataacgt tattgcgccg gttttaacag gtaatttaaa accaaatacg 1260
gatagtaatg cattaataga tcagcaaaat acaagtatta aagtatataa agtagataat 1320
gcagctgatt tatctgaaag ttactttgtg aatccagaaa actttgagga tgtcactaat 1380
agtgtgaata ttacattccc aaatccaaat caatataaag tagagtttaa tacgcctgat 1440
gatcaaatta caacaccgta tatagtagtt gttaatggtc atattgatcc gaatagcaaa 1500
ggtgatttag ctttacgttc aactttatat gggtataact cgaatataat ttggcgctct 1560
atgtcatggg acaacgaagt agcatttaat aacggatcag gttctggtga cggtatcgat 1620
aaaccagttg ttcctgaaca acctgatgag cctggtgaaa ttgaaccaat tccagag 1677
<210> 62
<211> 559
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 62
Met Asn Met Lys Lys Lys Glu Lys His Ala Ile Arg Lys Lys Ser Ile
1 5 10 15
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
Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr
195 200 205
Ser Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp

211

210 215 220
Ala Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asn Val Thr
225 230 235 240
Val Gly 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
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 Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Met Pro
325 330 335
Ala Tyr Ile Asp Pro Glu Asn Val Lys Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu
340 345 350
Ala Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp
355 360 365
Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr 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 Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu
405 410 415
Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser
420 425 430
Ile Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser Tyr
435 440 445
Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile
450 455 460
Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro 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 Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr
500 505 510
Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala
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
545 550 555

<210> 63
<211> 1677
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 63

atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60
gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120
gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180
agcgttagtg ctgcacctaa aacagacgac acaaacgtga gtgatactaa aacatcgtca 240
aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300
tcatcatcaa caaatgcaac tacggaagaa acgccggtaa ctggtgaagc tactactacg 360
acaacgaatc aagctaatac accggcaaca actcaatcaa gcaatacaaa tgcggaggaa 420
ttagtgaatc aaacaagtaa tgaaacgact tctaatgata ctaatacagt atcatctgta 480
aattcacctc aaaattctac aaatgcggaa aatgtttcaa caacgcaaga tacttcaact 540
gaagcaacac cttcaaacaa tgaatcagct ccacagaata cagatgcaag taataaagat 600
gtagttagtc aagcggttaa tccaagtacg cctagaatga gagcatttag tttagcggca 660
gtagctgcag atgcaccggc agctggcaca gatattacga atcagttgac agatgtgaaa 720
gttactattg actctggtac gactgtgtat ccgcaccaag caggttatgt caaactgaat 780

tatggttttt cagtgcctaa ttctgctgtt aaaggtgaca cattcaaaat aactgtacct 840
aaagaattaa acttaaatgg tgtaacttca actgctaaag tgccaccaat tatggctgga 900
gatcaagtat tggcaaatgg tgtaatcgat agtgatggta atgttattta tacatttaca 960
gactatgttg ataataaaga aaatgtaaca gctaatatta ctatgccagc ttatattgac 1020
cctgaaaatg ttacaaagac aggtaatgtg acattgacaa ctggcatagg aaccaatact 1080
gctagtaaga cagtattaat cgactatgag aaatatggac aattccataa tttatcaatt 1140
aaaggtacga ttgatcaaat cgataaaaca aataatacgt atcgccaaac aatttatgtc 1200
aatccaagcg gagataacgt tgtgttacct gccttaacag gtaatttaat tcctaataca 1260
aagagtaatg cgttaataga tgcaaaaaac actgatatta aagtttatag agtcgataat 1320
gctaatgatt tatctgaaag ttattatgtg aatcctagcg attttgaaga tgtaactaat 1380
caagttagaa tttcatttcc aaatgctaat caatacaaag tagaatttcc tacggacgat 1440
gaccaaatta caacaccgta tattgtagtt gttaatggcc atattgatcc tgctagtaca 1500
ggtgatttag cactacgttc gacattttat ggttatgatt ctaattttat atggagatct 1560
atgtcatggg acaacgaagt agcatttaat aacggatcag gttctggtga cggtatcgat 1620
aaaccagttg ttcctgaaca acctgatgag cctggtgaaa ttgaaccaat tccagag 1677

<210> 64
<211> 559
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 64

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

212

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
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
545 550 555

<210> 65
<211> 1677
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 65

atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60
gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120
gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180
agcgttagtg ctgcacctaa aacagacgac acaaacgtga gtgatactaa aacatcgtca 240
aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300
tcatcatcaa caaatgcaac tacggaagaa acgccggtaa ctggtgaagc tactactacg 360
acaacgaatc aagctaatac accggcaaca actcaatcaa gcaatacaaa tgcggaggaa 420
ttagtgaatc aaacaagtaa tgaaacgact tctaatgata ctaatacagt atcatctgta 480
aattcacctc aaaattctac aaatgcggaa aatgtttcaa caacgcaaga tacttcaact 540
gaagcaacac cttcaaacaa tgaatcagct ccacagagta cagatgcaag taataaagat 600
gtagttaatc aagcggttaa tacaagtgcg cctagaatga gagcatttag tttagcggca 660
gtagctgcag atgcaccggc agctggcaca gatattacga atcagttgac gaatgtgaca 720
gttggtattg actctggtac gactgtgtat ccgcaccaag caggttatgt caaactgaat 780
tatggttttt cagtgcctaa ttctgctgtt aaaggtgaca cattcaaaat aactgtacct 840
aaagaattaa acttaaatgg tgtaacttca actgctaaag tgccaccaat tatggctgga 900
gatcaagtat tggcaaatgg tgtaatcgat agtgatggta atgttattta tacatttaca 960
gactatgtaa atacttaaaga tgatgtaaaa gcaactttga ccatgcccgc ttatattaac 1020
cctgaaaatg ttaaaaagac aggtaatgtg acattggcta ctggcatagg tagtacaaca 1080
gcaaacaaaa cagtattagt agattatgaa aaatatggta agttttataa cttatctatt 1140
aaaggtacaa ttgaccaaat cgataaaaca aataatacgt atcgtcagac aatttatgtc 1200
aatccaagtg gagataacgt tattgcgccg gttttaacag gtaatttaaa accaaatacg 1260
gatagtaatg cattaataga tcagcaaaat acaagtatta aagtatataa agtagataat 1320
gcagctgatt tatctgaaag ttacttttgtg aatccagaaa actttgagga tgtcactaat 1380
agtgtgaata ttacattccc aaatccaaat caatataaag tagagtttaa tacgcctgat 1440
gatcaaatta caacaccgta tatagtagtt gttaatggtc atattgatcc gaatagcaaa 1500
ggtgatttag ctttacgttc aactttatat gggtataact cgaatataat ttggcgctct 1560
atgtcatggg acaacgaagt agcatttaat aacggatcag gttctggtga cggtatcgat 1620

aaaccagttg ttcctgaaca acctgatgag cctggtgaaa ttgaaccaat tccagag 1677

<210> 66
<211> 559
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 66

Met Asn Met Lys Lys Lys Glu Lys His Ala Ile Arg Lys Lys Ser Ile
1 5 10 15
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
Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr
195 200 205
Ser Ala 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 Asn Val Thr
225 230 235 240
Val Gly 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
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 Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Met Pro
325 330 335
Ala Tyr Ile Asn Pro Glu Asn Val Lys Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu
340 345 350
Ala Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp
355 360 365
Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr 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 Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu
405 410 415
Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser
420 425 430
Ile Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser Tyr

2B

435 440 445

Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile
450 455 460

Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro 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 Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr
500 505 510

Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala
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
545 550 555

<210> 67
<211> 1677
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 67

atgaatatga agaaacaaga aaaacacgca attcgtaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60
gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120
gaaaatagta tgacacaaac ggaaaatacg agtaatgaga gcaaaagtaa tgatccaagt 180
agcgttaatg ctgcacctaa aacagacaac acaaacgtga gtgattctaa tacaacgaca 240
aacactaata gtgacgaaac gaatgtagcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300
tcagcatcaa caaatgcaac tacagaagaa acaccggtaa ctggtgaagt tactactacg 360
gcaacgaatc aagctaatac accggcaaca actcaatcaa gcaatacaaa tgcggaagaa 420
tcagtgaatc aaacaagtaa tgaaacgact tctaatgata ctaatacagt atcatctgta 480
aattcacctc aaaattctac aaatgcggaa aatgtttcaa caacgcaaga catttcaact 540
gaagcaacac cttcaaacaa tgaatcagct ccacagagta cagatgcaag taataaagat 600
gtagttaatc aagcggttaa tacaagtgcg cctagaatga gagcatttag tttagcggct 660
gtagctgcag atgcaccggc tgctggcaaa gatattacga atcagttgac gaatgtgaca 720
gttggtattg actctggaga tacagtttat ccgcaccaag caggctatgt caaactgaat 780
tatgggttct cagtaccaaa tgaggctgtt caaggtgaca cattcaaaat aactgtgccc 840
aaagaattaa acttaaatgg tgtaacttca actgctaaag tgccaccaat tatggccgga 900
gatcaagtat tggcaaatgg tgtaatcgat agtgatggta atgttattta tacatttaca 960
gactatgtaa atactaaaga tgatgttaaa gcaactttga ccatgcccgc ttatattgac 1020
cctgaaaatg ttacaaagac aggtaatgtg acattggcta ctggcatagg tagtacaaca 1080
gcaaacaaaa cagtattagt agattatgaa aaatatggta agttttataa cttatctatt 1140
aaaggtacaa ttgaccaaat cgataaaaca aataatacgt atcgtcagac aatttatgtc 1200
aatccaagtg gagataacgt tattgcgccg gttttaacag gtaatttaaa accaaatacg 1260
gatagtaatg cattaataga tgcacaaaat actagtatta aagtatataa agttgataat 1320
gcatcagact tgtctgaaag ttattatgtg aatccagata actttgaaga tgtcactgat 1380
agtgtgaata ttacattccc aaatccaaat caatataaag tagagttcaa tacgcctgat 1440
gatcaaataa caacaccata tattgtagtt gttaatgggc atattgatcc taatagtaaa 1500
ggtgatttag ctttacgttc aactttatat ggatataatt cgaatataat ttggcgatca 1560
atgtcatggg ataatgaagt agcatttaat aacggatcag gttctggtga cggtatcgat 1620
aaacctgttg ttcctgaaca acctgatgag ccgggtgaaa ttgaaccaat tccagag 1677

<210> 68
<211> 559
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 68

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

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 Met Thr Gln Thr Glu
35 40 45

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

```
Ala Pro Lys Thr Asp Asn Thr Asn Val Ser Asp Ser Asn Thr Thr Thr
65                  70                  75                  80
Asn Thr Asn Ser Asp Glu Thr Asn Val Ala Gln Asn Pro Ala Gln Gln
                85                  90                  95
Glu Thr Thr Gln Ser Ala Ser Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro
            100                 105                 110
Val Thr Gly Glu Val Thr Thr Thr Ala Thr Asn Gln Ala Asn Thr Pro
        115                 120                 125
Ala Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Ser 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 Ile Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln
            180                 185                 190
Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr
        195                 200                 205
Ser Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp
    210                 215                 220
Ala Pro Ala Ala Gly Lys Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asn Val Thr
225                 230                 235                 240
Val Gly Ile Asp Ser Gly Asp Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr
                245                 250                 255
Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Glu Ala Val Gln Gly
            260                 265                 270
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 Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr Leu 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
Ala Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp
        355                 360                 365
Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr 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 Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu
                405                 410                 415
Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Ala Gln Asn Thr Ser
            420                 425                 430
Ile Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ser Asp Leu Ser Glu Ser Tyr
        435                 440                 445
Tyr Val Asn Pro Asp Asn Phe Glu Asp Val Thr Asp Ser Val Asn Ile
    450                 455                 460
Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro 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 Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr
            500                 505                 510
Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala
        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
```

2A

545 550 555

<210> 69
<211> 1677
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 69

atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60
gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120
gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180
agcattaatg ctgcacctaa aacagacaac acaaacgtga gtgatactaa accaacgtca 240
aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300
tcagcatcaa caaatgcaac tacggaagaa acgccggtaa ctggtgaagc tactactacg 360
acaacgaatc aagctaatac accggcaaca actcaatcaa gcaatacaaa tgcggaggaa 420
ttagtgaatc aaacaagtaa tgaaacgact tctaatgata ctaatacagt atcatctgta 480
aattcacctc aaaattctac aaatgcggaa aatgtttcaa caacgcaaga tacttcaact 540
gaagcaacac cttcaaacaa tgaatcagct ccacagagta cagatgcaag taataaagat 600
gtagttaatc aagcggttaa tacaagtgcg cctagaaaga gagcatttag tttagcggct 660
gtagctgcag atgcaccggc agctggcaca gatattacga atcagttgac agatgtgaaa 720
gttactattg actctggtac gactgtgtat ccgcaccaag caggttatgt caaactgaat 780
tatggttttt cagtgcctaa ttctgctgtt aaaggtgaca cattcaaaat aactgtacct 840
aaagaattaa acttaaatgg tgtaacttca actgctaaag tgccaccaat tatggctgga 900
gatcaagtat tggcaaatgg tgtaatcgat agtgatggta atgttattta tacatttaca 960
gactatgttg ataataaaga aaatgtaaca gctaatatta ctatgccagc ttatattgac 1020
cctgaaaatg ttacaaagac aggtaatgtg acattgacaa ctggcatagg aaccaatact 1080
gctagtaaga cagtattaat cgactatgag aaatatggac aattccataa tttatcaatt 1140
aaaggtacga ttgatcaaat cgataaaaca aataatacgt atcgccaaac aatttatgtc 1200
aatccaagcg gagataacgt tgtgttacct gccttaacag gtaatttaat tcctaataca 1260
aagagtaatg cgttaataga tgcaaaaaac actgatatta aagtttatag agtcgataat 1320
gctaatgatt tatctgaaag ttattatgtg aatcctagcg attttgaaga tgtaactaat 1380
caagttagaa tttcatttcc aaatgctaat caatacaaag tagaatttcc tacggacgat 1440
gaccaaatta caacaccgta tattgtagtt gttaatggcc atattgatcc tgctagtaca 1500
ggtgatttag cactacgttc gacattttat ggttatgatt ctaattttat atggagatct 1560
atgtcatggg acaacgaagt agcatttaat aacggatcag gttctggtga cggtatcgat 1620
aaaccagttg ttcctgaaca acctgatgag cctggtgaaa ttgaaccaat tccagag 1677

<210> 70
<211> 559
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 70

Met Asn Met Lys Lys Lys Glu Lys His Ala Ile Arg Lys Lys Ser Ile
1 5 10 15
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 Ile Asn Ala
50 55 60
Ala Pro Lys Thr Asp Asn Thr Asn Val Ser Asp Thr Lys Pro Thr 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 Ala 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
Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr
195 200 205
Ser Ala Pro Arg Lys 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
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
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
545 550 555

<210> 71
<211> 1677
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 71

atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60
gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120
gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180
agcgttagtg ctgcacctaa aacagacgac acaaacgtga gtgatactaa aacatcgtca 240
aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300
tcatcatcaa caaatgcaac tacggaagaa acgccggtaa ctggtgaagc tactactacg 360
acaacgaatc aagctaatac accggcaaca actcaatcaa gcaatacaaa tgcggaggaa 420
ttagtgaatc aaacaagtaa tgaaacgact tctaatgata ctaatacagt atcatctgta 480

215

aattcacctc aaaattctac aaatgcggaa aatgtttcaa caacgcaaga tacttcaact 540
gaagcaacac cttcaaacaa tgaatcagct ccacagaata cagatgcaag taataaagat 600
gtagttagtc aagcggttaa tccaagtacg cctagaatga gagcatttag tttagcggca 660
gtagctgcag atgcaccggc agctggcaca gatattacga atcagttgac agatgtgaaa 720
gttactattg actctggtac gactgtgtat ccgcaccaag caggttatgt caaactgaat 780
tatggttttt cagtgcctaa ttctcctgtt aaaggtgaca cattcaaaat aactgtacct 840
aaagaattaa acttaaatgg tgtaacttca actgctaaag tgccaccaat tatggctgga 900
gatcaagtat tggcaaatgg tgtaatcgat agtgatggta atgttattta tacatttaca 960
gactatgttg ataataaaga aaatgtaaca gctaatatta ctatgccagc ttatattgac 1020
cctgaaaatg ttacaaagac aggtaatgtg acattgacaa ctggcatagg aaccaatact 1080
gctagtaaga cagtattaat cgactatgag aaatatggac aattccataa tttatcaatt 1140
aaaggtacga ttgatcaaat cgataaaaca aataatacgt atcgccaaac aatttatgtc 1200
aatccaagcg gagataacgt tgtgttacct gccttaacag gtaatttaat tcctaataca 1260
aagagtaatg cgttaataga tgcaaaaaac actgatatta aagtttatag agtcgataat 1320
gctaatgatt tatctgaaag ttattatgtg aatcctagcg attttgaaga tgtaactaat 1380
caagttagaa tttcatttcc aaatgctaat caatacaaag tagaatttcc tacggacgat 1440
gaccaaatta caacaccgta tattgtagtt gttaatggcc atattgatcc tgctagtaca 1500
ggtgatttag cactacgttc gacattttat ggttatgatt ctaattttat atggagatct 1560
atgtcatggg acaacgaagt agcatttaat aacggatcag gttctggtga cggtatcgat 1620
aaaccagttg ttcctgaaca acctgatgag cctggtgaaa ttgaaccaat tccagag 1677

<210> 72
<211> 559
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 72

Met Asn Met Lys Lys Lys Glu Lys His Ala Ile Arg Lys Lys Ser Ile
1 5 10 15
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 Pro Val Lys Gly
260 265 270
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
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
545 550 555

<210> 73
<211> 1677
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 73

atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60
gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120
gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180
agcattaatg ctgcacctaa aacagacaac acaaacgtga gtgatactaa aacaacgtca 240
aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300
tcagcatcaa caaatgcaac tacggaagaa acgccggtaa ctggtgaaac tactactacg 360
gcaacgaatc aagctaatac accggcaaca actcaatcaa gcaatacaaa tgcggaggaa 420
ttagtgaatc aaacaagtaa tgaaacgact tctaatgata ctaatacagt atcatctgta 480
aattcacctc aaaattctac aaatgcggaa aatgtttcaa caacgcaaga tacttcaact 540
gaagcaacac cttcaaacaa tgaatcagct ccacagagta cagatgcaag taataaagat 600
gtagttaatc aagcggttaa tacaagtgcg cctagaatga gagcatttag tttagcggca 660
gtagctgcag atgcaccggc agctggcaca gatattacga atcagttgac agatgtgaaa 720
gttactattg actctggtac gactgtgtat ccgcaccaag caggttatgt caaactgaat 780
tatggttttt cagtgcctaa ttctgctgtt aaaggtgaca cattcaaaat aactgtacct 840
aaagaattaa acttaaatgg tgtaacttca actgctaaag tgccaccaat tatggctgga 900
gatcaagtat tggcaaatgg tgtaatcgat agtgatggta atgttattta tacatttaca 960
gactatgttg ataataaaga aaatgtaaca gctaatatta ctatgccagc ttatattgac 1020
cctgaaaatg ttacaaagac aggtaatgtg acattgacaa ctggcatagg aaccaatact 1080
gctagtaaga cagtattaat cgactatgag aaatatggac aattccataa tttatcaatt 1140
aaaggtacga ttgatcaaat cgataaaaca aataatacgt atcgccaaac aatttatgtc 1200
aatccaagcg gagataacgt tgtgttacct gccttaacag gtaatttaat tcctaataca 1260
aagagtaatg cgttaataga tgcaaaaaac actgatatta aagtttatag agtcgataat 1320

216

gctaatgatt tatctgaaag ttattatgtg aatcctagcg attttgaaga tgtaactaat 1380
caagttagaa tttcatttcc aaatgctaat caatacaaag tagaatttcc tacggacgat 1440
gaccaaatta caacaccgta tattgtagtt gttaatggcc atattgatcc tgctagtaca 1500
ggtgatttag cactacgttc gacattttat ggttatgatt ctaattttat atggagatct 1560
atgtcatggg acaacgaagt agcatttaat aacggatcag gttctggtga cggtatcgat 1620
aaaccagttg ttcctgaaca acctgatgag cctggtgaaa ttgaaccaat tccagag 1677

<210> 74
<211> 559
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 74

Met Asn Met Lys Lys Lys Glu Lys His Ala Ile Arg Lys Lys Ser Ile
1 5 10 15
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 Ile Asn Ala
50 55 60
Ala Pro Lys Thr Asp Asn Thr Asn Val Ser Asp Thr Lys Thr Thr 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 Ala Ser Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro
100 105 110
Val Thr Gly Glu Thr Thr Thr Thr Ala 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
Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr
195 200 205
Ser Ala 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
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
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
545 550 555

<210> 75
<211> 1677
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 75

atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60
gtgcttgtag gtacgttaat cggtttcgga ttacttagca gtaaagaagc agatgcaagt 120
gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180
agcgttaatg ctgcacctaa aacagacaac acaaacgtga gtgatactaa aacaacgtca 240
aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacagga aacgatacaa 300
tcagcatcaa caaatgcaac tacggaagaa acaccggtaa ctggtgaagc tactactacg 360
gcaacgaagc aagctaatac accggcaaca actcaatcaa gcaatacaaa tgcggaggaa 420
ttagtgaatc aaacaagtaa tgaaacgact tctaatgata ctaatacagt atcatctgta 480
aattcacctc aaaattctac aaatgcggaa aatgtttcaa caacgcaaga tacttcaact 540
gaagcaacac cttcaaacaa tgaatcagct ccacagagta cagatgcaag taataaagat 600
gtagttaatc aagcggttaa tacaagtgcg cctagaatga gagcatttag tttagcggct 660
gtagctgcag atgcaccggc tgctggcaca gatattacga atcagttgac agatgtgaaa 720
gttactattg actctggtac gactgtgtat ccgcaccaag caggttatgt caaactgaat 780
tatggttttt cagtgcctaa ttctgctgtt aaaggtgaca cattcaaaat aactgtacct 840
aaagaattaa acttaaatgg tgtaacttca actgctaaag tgccaccaat tatggccgga 900
gatcaagtat tggcaaatgg tgtaatcgat agtgatggta atgttattta tacatttaca 960
gactatgtaa atactaaaga tgatgttaaa gcaactttga ccatgcccgc ttatattgac 1020
cctgaaaatg ttacaaagac aggtaatgtg acattggcta ctggcatagg tagtacaaca 1080
gcaaacaaaa cagtattagt agattatgaa aaatatggta agttttataa cttatctatt 1140
aaaggtacaa ttgaccaaat cgataaaaca aataatacgt atcgtcagac aatttatgtc 1200
aatccaagtg gagataacgt tattgcgccg gttttaacag gtaatttaaa accaaatacg 1260
gatagtaatg cattaataga tcagcaaaat acaagtatta aagtatataa agtagataat 1320
gcagctgatt tatctgaaag ttactttgtg aatccagaaa actttgagga tgtcactaat 1380
agtgtgaata ttacattccc aaatccaaat caatataaag tagagtttaa tacgcctgat 1440
gatcaaatta caacaccgta tattgtagtt gttaatggtc atattgatcc gaatagcaaa 1500
ggtgatttag ctttacgttc aactttatat gggtatgact caaggtttgt atggagatct 1560
atgtcatggg acaacgaagt agcatttaat aacggatcag gttctggtga cggtatcgat 1620
aaaccagttg ttcctgaaca acctgatgag cctggtgaaa ttgaaccaat tccagag 1677

<210> 76
<211> 559
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 76

Met Asn Met Lys Lys Lys Glu Lys His Ala Ile Arg Lys Lys Ser Ile
1 5 10 15
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 Asn Ala
    50                  55                  60
Ala Pro Lys Thr Asp Asn Thr Asn Val Ser Asp Thr Lys Thr Thr 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 Ile Gln Ser Ala Ser Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro
            100                 105                 110
Val Thr Gly Glu Ala Thr Thr Thr Ala Thr Lys 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
Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr
        195                 200                 205
Ser Ala 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
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 Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr Leu 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
Ala Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp
        355                 360                 365
Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr 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 Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu
                405                 410                 415
Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser
            420                 425                 430
Ile Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser Tyr
        435                 440                 445
Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile
    450                 455                 460
Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro 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 Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr
            500                 505                 510
```

Asp Ser Arg Phe Val Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala
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
545 550 555

<210> 77
<211> 1677
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 77

atgaatatga agaaacaaga aaaacacgca attcgtaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60
gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120
gaaaatagtg ttacgcaaac ggaaaatacg agtaatgaga gcaaaagtaa tgattcgagt 180
agcgttaatg ctgcacctaa aacagacaac acaaacgtga gtgattctaa tacaacgaca 240
aacactaata gtgacgaaac gaatgtagcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300
tcagcatcaa caaatgcaac tacagaagaa acaccggtaa ctggtgaagt tactactacg 360
gcaacgaatc aagctaatac accggcaaca actcaatcaa gcaatacaaa tgcggaaaaa 420
tcagtgaatc aaacaagtaa tgaaacgact tctaatgata ctaatacagt atcatctgta 480
aattcacctc aaaattctac aaatgcggaa aatgtttcaa caacgcaaga tacttcaact 540
gaagcaaaac cttcaaacaa tgaatcagct ccacagagta cagatgcaag taataaagat 600
gtagttaatc aagcggttaa tacaagtgcg cctagaatga gagcatttag tttagcggct 660
gtagctgcag atgcaccggc tgctggcaca gatattacga atcagttgac gaatgtgaca 720
gttggtattg actctggaga tacagtttat ccgcaccaag caggctatgt caaactgaat 780
tatgggttct cagtacccaa ttctgcggtt caaggtgaca catttaaaat aactgtacct 840
aaagaattaa acttaaatgg tgtaacctca actgctaaag tgccaccaat tatggccgga 900
gatcaagtat tggcaaatgg tgtaatcgat agtgatggta atgttattta tacatttaca 960
gactatgtaa atactaaaga tgatgttaaa gcaacattaa ctgtgccggc ttatattgac 1020
cctgaatatg ttacacatac tggtaatgtg acattggcta ctggcatagg aaatacaaca 1080
gcaaacaaaa cagtattagt agattatgaa aaatatggta agttttataa cttatctatt 1140
aaaggtacaa ttgaccaaat cgataaaaca aataatacgt atcgtcagac aatttatgtc 1200
aatccaagtg gagataacgt tattgcaccg gttttaacag gtaatttaaa accaaatacg 1260
gaaagtaatg cattaataga tcagcaaaat acaagtatta aagtatataa agtagataat 1320
gcagctgatt tatctgaaag ttactttgtg aatccagaaa actttgagga tgtcactaat 1380
agtgtaaata ttacattccc aaatccaaat caatataaag tagagtttaa tacgcctgat 1440
gatcaaataa caacaccata tattgtagtt gttaatgggc atattgatcc taatagtaaa 1500
ggtgatttag ctttacgttc aactttatat ggatataatt cgaatataat ttggagatct 1560
atgtcatggg acaacgaagt agcatttaat aacggatcag gttctggtga cggtatcgat 1620
aaacctgttg ttcctgaaca acctgatgag cctggtgaaa ttgaaccaat tccagag 1677

<210> 78
<211> 559
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 78

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

218

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 Lys Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln
180 185 190
Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr
195 200 205
Ser Ala 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 Asn Val Thr
225 230 235 240
Val Gly Ile Asp Ser Gly Asp 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 Gln Gly
260 265 270
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 Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Val Pro
325 330 335
Ala Tyr Ile Asp Pro Glu Tyr Val Thr His Thr Gly Asn Val Thr Leu
340 345 350
Ala Thr Gly Ile Gly Asn Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp
355 360 365
Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr 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 Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu
405 410 415
Lys Pro Asn Thr Glu Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser
420 425 430
Ile Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser Tyr
435 440 445
Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile
450 455 460
Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro 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 Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr
500 505 510
Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala
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
545 550 555

<210> 79
<211> 1677
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 79

atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60
gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120
gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180

agcgttagtg ctgcacctaa aacagacgac acaaacgtga gtgatactaa aacatcgtca 240
aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300
tcatcatcaa caaatgcaac tacggaagaa acgccggtaa ctggtgaagc tactactacg 360
acaacgaatc aagctaatac accggcaaca actcaatcaa gcaatacaaa tgcggaggaa 420
ttagtgaatc aaacaagtaa tgaaacgact tctaatgata ctaatacagt atcatctgta 480
aattcacctc aaaattctac aaatgcggaa aatgtttcaa caacgcaaga tacttcaact 540
gaagcaacac cttcaaacaa tgaatcagct ccacagagta cagatgcaag taataaagat 600
gtagttaatc aagcggttaa tacaagtgcg cctagaatga gagcatttag tttagcggca 660
gtagctgcag atgcaccggt agctggcaca gatattacga atcagttgac gaatgtgaca 720
gttggtattg actctggtac gactgtgtat ccgcaccaag caggttatgt caaactgaat 780
tatggttttt cagtgcctaa ttctgctgtt aaaggtgaca cattcaaaat aactgtacct 840
aaagaattaa acttaaatgg tgtaacttca actgctaaag tgccaccaat tatggctgga 900
gatcaagtat tggcaaatgg tgtaatcgat agtgatggta atgttattta tacatttaca 960
gactatgtaa atactaaaga tgatgtaaaa gcaactttga ccatgcccgc ttatattgac 1020
cctgaaaatg ttaaaaagac aggtaatgtg acattggcta ctggcatagg tagtacaaca 1080
gcaaacaaaa cagtattagt agattatgaa aaatatggta agttttataa cttatctatt 1140
aaaggtacaa ttgaccaaat cgataaaaca aataatacgt atcgtcagac aatttatgtc 1200
aatccaagtg gagataacgt tattgcgccg gttttaacag gtaatttaaa accaaatacg 1260
gatagtaatg cattaataga tcagcaaaat acaagtatta aagtatataa agtagataat 1320
gcagctgatt tatctgaaag ttactttgtg aatccagaaa actttgagga tgtcactaat 1380
agtgtgaata ttacattccc aaatccaaat caatataaag tagagtttaa tacgcctgat 1440
gatcaaatta caacaccgta tatagtagtt gttaatggtc atattgatcc gaatagcaaa 1500
ggtgatttag ctttacgttc aactttatat gggtataact cgaatataat ttggcgctct 1560
atgtcatggg acaacgaagt agcatttaat aacggatcag gttctggtga cggtatcgat 1620
aaaccagttg ttcctgaaca acctgatgag cctggtgaaa ttgaaccaat tccagag 1677

<210> 80
<211> 559
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 80

Met Asn Met Lys Lys Lys Glu Lys His Ala Ile Arg Lys Lys Ser Ile
1 5 10 15
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
Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr
195 200 205
Ser Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp
210 215 220
Ala Pro Val Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asn Val Thr
225 230 235 240
Val Gly Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr

29

245 250 255
Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly
260 265 270
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 Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Met Pro
325 330 335
Ala Tyr Ile Asp Pro Glu Asn Val Lys Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu
340 345 350
Ala Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp
355 360 365
Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr 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 Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu
405 410 415
Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser
420 425 430
Ile Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser Tyr
435 440 445
Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile
450 455 460
Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro 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 Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr
500 505 510
Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala
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
545 550 555

<210> 81
<211> 1677
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 81

atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60
gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120
gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180
agcgttagtg ctgcacctaa aacagacgac acaaacgtga gtgatactaa aacatcgtca 240
aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300
tcatcatcaa caaatgcaac tacggaagaa acgccggtaa ctggtgaagc tactactacg 360
acaacgaatc aagctaatac accggcaaca actcaatcaa gcaatacaaa tgcggaggaa 420
ttagtgaatc aaacaagtaa tgaaacgact tttaatgata ctaatacagt atcatctgta 480
aattcacctc aaaattctac aaatgcggaa aatgtttcaa caacgcaaga tacttcaact 540
gaagcaacac cttcaaacaa tgaatcagct ccacagagta cagatgcaag taataaagat 600
gtagttaatc aagcggttaa tacaagtgcg cctagaatga gagcatttag tttagcggca 660
gtagctgcag atgcaccggc agctggcaca gatattacga atcagttgac gaatgtgaca 720
gttggtattg actctggtac gactgtgtat ccgcaccaag caggttatgt caaactgaat 780
tatggttttt cagtgcctaa ttctgctgtt aaaggtgaca cattcaaaat aactgtacct 840
aaagaattaa acttaaatgg tgtaacttca actgctaaag tgccaccaat tatggctgga 900
gatcaagtat tggcaaatgg tgtaatcgat agtgatggta atgttattta tacatttaca 960
gactatgtaa atactaaaga tgatgtaaaa gcaactttga ccatgcccgc ttatattgac 1020

cctgaaaatg ttaaaaagac aggtaatgtg acattggcta ctggcatagg tagtacaaca 1080
gcaaacaaaa cagtattagt agattatgaa aaatatggta agttttataa cttatctatt 1140
aaaggtacaa ttgaccaaat cgataaaaca aataatacgt atcgtcagac aatttatgtc 1200
aatccaagtg gagataacgt tattgcgccg gttttaacag gtaatttaaa accaaatacg 1260
gatagtaatg cattaataga tcagcaaaat acaagtatta aagtatataa agtagataat 1320
gcagctgatt tatctgaaag ttactttgtg aatccagaaa actttgagga tgtcactaat 1380
agtgtgaata ttacattccc aaatccaaat caatataaag tagagtttaa tacgcctgat 1440
gatcaaatta caacaccgta tatagtagtt gttaatggtc atattgatcc gaatagcaaa 1500
ggtgatttag ctttacgttc aactttatat gggtataact cgaatataat ttggcgctct 1560
atgtcatggg acaacgaagt agcatttaat aacggatcag gttctggtga cggtatcgat 1620
aaaccagttg ttcctgaaca acctgatgag cctggtgaaa ttgaaccaat tccagag 1677

<210> 82
<211> 559
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 82

```
Met Asn Met Lys Lys Lys Glu Lys His Ala Ile Arg Lys Lys Ser Ile
1               5                  10                  15
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 Phe 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
Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr
        195                 200                 205
Ser Ala 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 Asn Val Thr
225                 230                 235                 240
Val Gly 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
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 Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Met Pro
                325                 330                 335
Ala Tyr Ile Asp Pro Glu Asn Val Lys Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu
            340                 345                 350
Ala Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp
```

220

355 360 365
Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr 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 Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu
405 410 415
Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser
420 425 430
Ile Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser Tyr
435 440 445
Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile
450 455 460
Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro 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 Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr
500 505 510
Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala
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
545 550 555

<210> 83
<211> 1674
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 83

atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60
gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120
gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180
agcgttagtg ctgcacctaa aacagacgac acaaacgtga gtgatactaa aacatcgtca 240
aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300
tcagcattaa caaatgcaac tacggaagaa actccggtaa ctggtgaagc tactacggca 360
acgaatcaag ctaatacacc ggcaacaact caatcaagca atacaaatgc ggaggaatta 420
gtgaatcaaa caagtaatga aacgacttct aatgatacta atacagtatc atctgtaaat 480
tcacctcaaa attctacaaa tgcggaaaat gtttcaacaa cgcaagatac ttcaactgaa 540
gcaacacctt caaacaatga atcagctcca cagagtacag atgcaagtaa taaagatgta 600
gttaatcaag cggttaatac aagtgcgcct agaatgagag catttagttt atcggcagta 660
gctgcagatg caccggcagc tggcaaagat attacgaatc agttgacgaa tgtgacagtt 720
ggtattgact ctggagatac agtttatccg caccaagcag gctatgtcaa actgaattat 780
ggtttttcag tgcctaattc tgctgttaaa ggtgacacat tcaaaataac tgtacctaaa 840
gaattaaact taaatggtgt aacttcaact gctaaagtgc ctccaattat ggccggagat 900
caagtattgg caaatggtgt aatcgatagt gatggtaatg ttatttatac atttacagac 960
tatgttgata ctaaagaaaa tgtaacagct aatattacta tgccagctta tattgaccct 1020
gaaaatgtta caaagacagg taatgtaaca ttgacaactg gcataggtag tacaacagca 1080
aacaaaacag tattagtaga ttatgaaaaa tatggtaagt tttataactt atctattaaa 1140
ggtacaattg accaaatcga taaaacaaat aatacgtatc gtcagacaat ttatgtcaat 1200
ccaagtggag ataatgttat tgcgccggtt ttaacaggta atttaaaacc aaatacggat 1260
agtaatgcat taatagatca gcaaaatata agtattaaag tatataaagt agataatgca 1320
gctgatttat ctgaaagtta ctttgtgaat ccagaaaact ttgaggatgt cactaatagt 1380
gtgaatatta cattcccaaa tccaaatcaa tataaagtag agtttaatac gcctgatgat 1440
caaattacaa caccgtatat tgtagttgtt aatggtcata ttgatccgaa tagcaaaggt 1500
gatttagctt tacgttcaac tttatatgga tatgactcaa ggtttgtatg gagatctatg 1560
tcatgggaca acgaagtagc atttaataac ggatcaggtt ctggtgacgg tatcgataaa 1620
ccagttgttc ctgaacaacc tgatgagcct ggtgaaattg aaccaattcc agag 1674

<210> 84
<211> 558
<212> PRT

<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 84

```
Met Asn Met Lys Lys Lys Glu Lys His Ala Ile Arg Lys Lys Ser Ile
1               5                  10                  15
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 Ala Leu Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro
            100                 105                 110
Val Thr Gly Glu Ala Thr Thr Ala Thr Asn Gln Ala Asn Thr Pro Ala
        115                 120                 125
Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln Thr
    130                 135                 140
Ser Asn Glu Thr Thr Ser Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val Asn
145                 150                 155                 160
Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln Asp
                165                 170                 175
Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln Ser
            180                 185                 190
Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr Ser
        195                 200                 205
Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ser Ala Val Ala Ala Asp Ala
    210                 215                 220
Pro Ala Ala Gly Lys Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asn Val Thr Val
225                 230                 235                 240
Gly Ile Asp Ser Gly Asp Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr Val
                245                 250                 255
Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly Asp
            260                 265                 270
Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val Thr
        275                 280                 285
Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu Ala
    290                 295                 300
Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr Asp
305                 310                 315                 320
Tyr Val Asp Thr Lys Glu Asn Val Thr Ala Asn Ile Thr Met Pro Ala
                325                 330                 335
Tyr Ile Asp Pro Glu Asn Val Thr Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu Thr
            340                 345                 350
Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp Tyr
        355                 360                 365
Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile Asp
    370                 375                 380
Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val Asn
385                 390                 395                 400
Pro Ser Gly Asp Asn Val Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu Lys
                405                 410                 415
Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser Ile
            420                 425                 430
Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser Tyr Phe
        435                 440                 445
Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile Thr
    450                 455                 460
Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro Asp Asp
```

465 470 475 480
Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Asn Gly His Ile Asp Pro
485 490 495
Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr Asp
500 505 510
Ser Arg Phe Val Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala Phe
515 520 525
Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val Pro
530 535 540
Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
545 550 555

<210> 85
<211> 1674
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 85

atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60
gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120
gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180
agcgttagtg ctgcacctaa aacagacgac acaaacgtga gtgatactaa aacatcgtca 240
aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300
tcagcattaa caaatgcaac tacggaagaa actccgttaa ctggtgaagc tactacggca 360
acgaatcaag ctaatacacc ggcaacaact caatcaagca atacaaatgc ggaggaatta 420
gtgaatcaaa caagtaatga aacgacttct aatgatacta atacagtatc atctgtaaat 480
tcacctcaaa attctacaaa tgcggaaaat gtttcaacaa cgcaagatac ttcaactgaa 540
gcaacacctt caaacaatga atcagctcca cagagtacag atgcaagtaa taaagatgta 600
gttaatcaag cggttaatac aagtgcgcct agaatgagag catttagttt agcggcagta 660
gctgcagatg caccggcagc tggcacagat attacgaatc agttgacaga tgtgaaagtt 720
actattgact ctggtacgac tgtgtatccg caccaagcag gttatgtcaa actgaattat 780
ggtttttcag tgcctaattc tgctgttaaa ggtgacacat tcaaaataac tgtacctaaa 840
gaattaaact taaatggtgt aacttcaact gctaaagtgc ctccaattat ggccggagat 900
caagtattgg caaatggtgt aatcgatagt gatggtaatg ttatttatac atttacagac 960
tatgttgata ctaaaaatga tgttaaagca acactaactg tgcctgcata cattgatcca 1020
gaaaatgtta caaagacggg taatgtaaca ttgaaaactg gcataggaac caatactgat 1080
agtaagacag ttttaatcga ctatgagaaa tatggacaat tccataattt atcaattaaa 1140
ggtacgattg atcaaatcga taaaacaaat aatacgtatc gtcaaacaat ttatgtcaat 1200
ccaagcggag ataacgttgt gttacctgcc ttaacaggta atttaattcc taatacaaag 1260
agtaatgcgt taatagatgc aaaaaacact gatattaaag tttatagagt agataatgct 1320
aatgatttat ctgaaagtta ttatgtgaat cctagcgatt ttgaagatgt aactaatcaa 1380
gttagaattt catttccaaa tgctaatcaa tacaaagtag aatttcctac ggacgatgat 1440
caaattacaa caccgtatat tgtagttgtt aatggccata ttgatcctgc tagcacaggt 1500
gatttagcac tacgttcgac attttatggt tatgattcta attttatatg gagatctatg 1560
tcatgggaca acgaagtagc atttaataac ggatcaggtt caggtgacgg tatcgataaa 1620
cctgttgttc ctgaacaacc tgatgagcct ggtgaaattg aaccaattcc agag 1674

<210> 86
<211> 558
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 86

Met Asn Met Lys Lys Lys Glu Lys His Ala Ile Arg Lys Lys Ser Ile
1 5 10 15
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 Ala Leu Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro
100 105 110
Leu Thr Gly Glu Ala Thr Thr Ala Thr Asn Gln Ala Asn Thr Pro Ala
115 120 125
Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln Thr
130 135 140
Ser Asn Glu Thr Thr Ser Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val Asn
145 150 155 160
Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln Asp
165 170 175
Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln Ser
180 185 190
Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr Ser
195 200 205
Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp Ala
210 215 220
Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asp Val Lys Val
225 230 235 240
Thr Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr Val
245 250 255
Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly Asp
260 265 270
Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val Thr
275 280 285
Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu Ala
290 295 300
Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr Asp
305 310 315 320
Tyr Val Asp Thr Lys Asn Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Val Pro Ala
325 330 335
Tyr Ile Asp Pro Glu Asn Val Thr Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu Lys
340 345 350
Thr Gly Ile Gly Thr Asn Thr Asp Ser Lys Thr Val Leu Ile Asp Tyr
355 360 365
Glu Lys Tyr Gly Gln Phe His Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile Asp
370 375 380
Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val Asn
385 390 395 400
Pro Ser Gly Asp Asn Val Val Leu Pro Ala Leu Thr Gly Asn Leu Ile
405 410 415
Pro Asn Thr Lys Ser Asn Ala Leu Ile Asp Ala Lys Asn Thr Asp Ile
420 425 430
Lys Val Tyr Arg Val Asp Asn Ala Asn Asp Leu Ser Glu Ser Tyr Tyr
435 440 445
Val Asn Pro Ser Asp Phe Glu Asp Val Thr Asn Gln Val Arg Ile Ser
450 455 460
Phe Pro Asn Ala Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Pro Thr Asp Asp Asp
465 470 475 480
Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp Pro
485 490 495
Ala Ser Thr Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Phe Tyr Gly Tyr Asp
500 505 510
Ser Asn Phe Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala Phe
515 520 525
Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val Pro
530 535 540
Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
545 550 555

<210> 87
<211> 1674
<212> ADN

<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 87
atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60
gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120
gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180
agcgttaatg ctgcacctaa aacagacaac acaaacgtga gtgatactaa aacaacgtca 240
aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caatatctag cacaacagga aacgacacaa 300
tcagtatcaa caaatgcaac tacggaagaa acaccggtaa ctggtgaagc tactacggca 360
acgaatcaag ctaatacacc ggcaacaact caatcaagca atacaaatgc ggaggaatta 420
gtgaatcaaa caagtaatga aacgacttct aatgatacta atacagtatc atctgtaaat 480
tcacctcaaa attctacaaa tgcggaaaat gtttcaacaa cgcaagatac ttcaactgaa 540
gcaacacctt caaacaatga atcagctcca cagagtacag atgcaagtaa taaagatgta 600
gttaatcaag cggttaatac aagtgcgcct agaatgagag catttagttt agcggctgta 660
gctgcagatg caccggcagc tggcacagat attacgaatc agttgacgaa tgtgacagtt 720
ggtattgact ctggtacgac tgtgtatccg caccaagcag gttatgtcaa actgaattat 780
ggtttttcag tgcctaattc tgctgttaaa ggtgacacat tcaaaataac tgtacctaaa 840
gaattaaact taaatggtgt aacttcaact gctaaagtgc ctccaattat ggctggagat 900
caagtattgg caaatggtgt aatcgataat gatggtaatg ttatttatac atttacagac 960
tatgtaaata ctaaagatga tgttaaagca actttgacta tgcccgctta tattgaccct 1020
gaaaatgtta caaagacagg taatgtgaca ttggctactg gcataggtag tacaacagca 1080
aacaaaacag tattagtaga ttatgaaaaa tatggtaagt tttataactt atctattaaa 1140
ggtacaattg accaaatcga taaaacaaat aatacgtatc gtcagacaat ttatgtcaat 1200
ccaagtggag ataacgttat tgcgccggtt ttaacaggta atttaaaacc aaatacggat 1260
agtaatgcat taatagatca gcaaaataca agtattaaag tatataaagt agataatgca 1320
gctgatttat ctgaaagtta ctttgtgaat ccagaaaact ttgaggatgt cactaatagt 1380
gtgaatatta cattcccaaa tccaaatcaa tataaagtag agtttccaac agacgatgat 1440
caaattacaa caccgtatat tgtagttgtt aatggtcata ttgatccgaa tagcaaaggt 1500
gatttagctt tacgttcaac tttatatggg tataactcga atataatttg gcgctctatg 1560
tcatgggaca acgaagtagc atttaataac ggatcaggtt ctggtgacgg tatcgataaa 1620
cctgttgttc ctgaacaacc tgatgagcct ggtgaaattg aaccaattcc agag 1674
<210> 88
<211> 558
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 88

```
Met Asn Met Lys Lys Lys Glu Lys His Ala Ile Arg Lys Lys Ser Ile
1               5                  10                  15
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 Asn Ala
    50                  55                  60
Ala Pro Lys Thr Asp Asn Thr Asn Val Ser Asp Thr Lys Thr Thr Ser
65                  70                  75                  80
Asn Thr Asn Asn Gly Glu Thr Ser Val Ala Gln Tyr Leu Ala Gln Gln
                85                  90                  95
Glu Thr Thr Gln Ser Val Ser Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro
            100                 105                 110
Val Thr Gly Glu Ala Thr Thr Ala Thr Asn Gln Ala Asn Thr Pro Ala
        115                 120                 125
Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln Thr
    130                 135                 140
Ser Asn Glu Thr Thr Ser Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val Asn
145                 150                 155                 160
Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln Asp
                165                 170                 175
Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln Ser
            180                 185                 190
Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr Ser
        195                 200                 205
```

Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp Ala
210 215 220
Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asn Val Thr Val
225 230 235 240
Gly Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr Val
245 250 255
Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly Asp
260 265 270
Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val Thr
275 280 285
Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu Ala
290 295 300
Asn Gly Val Ile Asp Asn Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr Asp
305 310 315 320
Tyr Val Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Met Pro Ala
325 330 335
Tyr Ile Asp Pro Glu Asn Val Thr Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala
340 345 350
Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp Tyr
355 360 365
Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile Asp
370 375 380
Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val Asn
385 390 395 400
Pro Ser Gly Asp Asn Val Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu Lys
405 410 415
Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser Ile
420 425 430
Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser Tyr Phe
435 440 445
Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile Thr
450 455 460
Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Pro Thr Asp Asp Asp
465 470 475 480
Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp Pro
485 490 495
Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr Asn
500 505 510
Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala Phe
515 520 525
Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val Pro
530 535 540
Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
545 550 555

<210> 89
<211> 1674
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 89

atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60
gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120
gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180
agcgttagtg ctgcacctaa aacagacgac acaaacgtga gtgatactaa aacatcgtca 240
aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300
tcagcattaa caaatgcaac tacggaagaa actccggtaa ctggtgaagc tactacggca 360
acgaatcaag ctaatacacc ggcaacaact caatcaagca atacaaatgc ggaggaatta 420
gtgaatcaaa caagtaatga aacgacttct aatgatacta atacagtatc atctgtaaat 480
tcacctcaaa attctacaaa tgcggaaaat gtttcaacaa cgcaagatac ttcaactgaa 540
gcaacacctt caaacaatga atcagctcca cagaatacag atgcaagtaa taaagatgta 600
gttaatcaag cggttaatac aagtgcgcct agaaagagag catttagttt agcggctgta 660
gctgcagatg caccggcagc tggcacagat attacgaatc agttgacaga tgtgaaagtt 720

actattgact ctggtacgac tgtgtatccg caccaagcag gttatgtcaa actgaattat 780
ggtttttcag tgcctaattc tgctgttaaa ggtgacacat tcaaaataac tgtacctaaa 840
gaattaaact taaatggtgt aacttcaact gctaaagtgc caccaattat ggctggagat 900
caagtattgg caaatggtgt aatcgatagt gatggtaatg ttatttatac atttacagac 960
tatgttgata ataaagaaaa tgtaacagct aatattacta tgccagctta tattgaccct 1020
gaaaatgtta caaagacagg taatgtgaca ttgacaactg gcataggaac caatactgct 1080
agtaagacag tattaatcga ctatgagaaa tatggacaat tccataattt atcaattaaa 1140
ggtacgattg atcaaatcga taaaacaaat aatacgtatc gccaaacaat ttatgtcaat 1200
ccaagcggag ataacgttgt gttacctgcc ttaacaggta atttaattcc taatacaaag 1260
agtaatgcgt taatagatgc aaaaaacact gatattaaag tttatagagt cgataatgct 1320
aatgatttat ctgaaagtta ttatgtgaat cctagcgatt ttgaagatgt aactaatcaa 1380
gttagaattt catttccaaa tgctaatcaa tacaaagtag aatttcctac ggacgatgac 1440
caaattacaa caccgtatat tgtagttgtt aatggccata ttgatcctgc tagtacaggt 1500
gatttagcac tacgttcgac attttatggt tatgattcta attttatatg gagatctatg 1560
tcatgggaca acgaagtagc atttaataac ggatcaggtt ctggtgacgg tatcgataaa 1620
ccagttgttc ctgaacaacc tgatgagcct ggtgaaattg aaccaattcc agag 1674

<210> 90
<211> 558
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 90

Met Asn Met Lys Lys Lys Glu Lys His Ala Ile Arg Lys Lys Ser Ile
1 5 10 15
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 Ala Leu Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro
100 105 110
Val Thr Gly Glu Ala Thr Thr Ala Thr Asn Gln Ala Asn Thr Pro Ala
115 120 125
Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln Thr
130 135 140
Ser Asn Glu Thr Thr Ser Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val Asn
145 150 155 160
Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln Asp
165 170 175
Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln Asn
180 185 190
Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr Ser
195 200 205
Ala Pro Arg Lys Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp Ala
210 215 220
Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asp Val Lys Val
225 230 235 240
Thr Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr Val
245 250 255
Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly Asp
260 265 270
Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val Thr
275 280 285
Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu Ala
290 295 300
Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr Asp
305 310 315 320

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

<210> 91
<211> 1674
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 91

atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60
gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120
gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180
agcgttagtg ctgcacctaa aacagacgac acaaacgtga gtgatactaa aacatcgtca 240
aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300
tcatcattaa caaatgcaac tacggaagaa actccggtaa ctggtgaagc tactacggca 360
acgaatcaag ctaatacacc ggcaacaact caatcaagca atacaaatgc ggaggaatta 420
gtgaatcaaa caagtaatga aacgacttct aatgatacta atacagtatc atctgtaaat 480
tcacctcaaa attctacaaa tgcggaaaat gtttcaacaa cgcaagatac ttcaactgaa 540
gcaacacctt caaacaatga atcagctcca cagagtacag atgcaagtaa taaagattta 600
gttaatcaag cggttaatac aagtgcgcct agaatgagag catttagttt agcggcagta 660
gctgcagatg cacctgcagc tggcacagat attacgaatc agttgacaga tgttaaagtt 720
actattgact ctggtacgac tgtgtatccg caccaagcag gttatgtcaa actgaattat 780
ggtttttcag tgcctaattc tgctgttaaa ggtgacacat tcaaaataac tgtacctaaa 840
gaattaaact taaatggtgt aacttcaact gctaaagtgc caccaattat ggctggagat 900
caagtattgg caaatggtgt aatcgatagt gatggtaatg ttatttatac atttacagac 960
tatgttgata ataaaaacga tgttaaagca actttgacca tgcccgctta ttatgatcca 1020
gaaaatgtaa cgaaaacagg taatgtaaca ttgacaactg gcataggtag tacaacagca 1080
aacaaaacag tattagtaga ttatgaaaaa tatggtaagt tttataactt atctattaaa 1140
ggtacaattg accaaatcga taaaacaaat aatacgtatc gtcagacaat ttatgtcaat 1200
ccaagtggag ataacgttat tgcgccggtt ttaacaggta atttaaaacc aaatacggat 1260
agtaatgcat taatagatca gcaaaataca agtattaaag tatataaagt agataatgca 1320
gctgatttat ctgaaagtta ctttgtaaat ccagaaaact ttgaggatgt cactaatagt 1380
gtgaatatta cattcccaaa tccaaatcaa tataaagtag agtttaatac gcctgatgat 1440
caaattacaa caccgtatat tgtagttgtt aatggtcata ttgatccgaa tagcaaaggt 1500
gatttagctt tacgttcaac tttatatggg tataactcga atataatttg gcgctctatg 1560

224

tcatgggaca acgaagtagc atttaataac ggatcaggtt ctggtgacgg tatcgataaa 1620
cctgttgtcc ctgaacaacc tgatgagcct ggtgaaattg aaccaattcc agag 1674
<210> 92
<211> 558
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 92

```
Met Asn Met Lys Lys Lys Glu Lys His Ala Ile Arg Lys Lys Ser Ile
1               5                  10                  15
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 Leu Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro
            100                 105                 110
Val Thr Gly Glu Ala Thr Thr Ala Thr Asn Gln Ala Asn Thr Pro Ala
        115                 120                 125
Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln Thr
    130                 135                 140
Ser Asn Glu Thr Thr Ser Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val Asn
145                 150                 155                 160
Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln Asp
                165                 170                 175
Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln Ser
            180                 185                 190
Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Leu Val Asn Gln Ala Val Asn Thr Ser
        195                 200                 205
Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp Ala
    210                 215                 220
Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asp Val Lys Val
225                 230                 235                 240
Thr Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr Val
                245                 250                 255
Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly Asp
            260                 265                 270
Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val Thr
        275                 280                 285
Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu Ala
    290                 295                 300
Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr Asp
305                 310                 315                 320
Tyr Val Asp Asn Lys Asn Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Met Pro Ala
                325                 330                 335
Tyr Ile Asp Pro Glu Asn Val Thr Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu Thr
            340                 345                 350
Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp Tyr
        355                 360                 365
Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile Asp
    370                 375                 380
Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val Asn
385                 390                 395                 400
Pro Ser Gly Asp Asn Val Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu Lys
                405                 410                 415
Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser Ile
            420                 425                 430
```

Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser Tyr Phe
435 440 445
Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile Thr
450 455 460
Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro Asp Asp
465 470 475 480
Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp Pro
485 490 495
Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr Asn
500 505 510
Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala Phe
515 520 525
Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val Pro
530 535 540
Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
545 550 555

<210> 93
<211> 1674
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 93

atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60
gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120
gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgatccaagt 180
agcgttaatg ctgcacctaa aacagacaac acaaacgtga gtgatactaa aacatcgtca 240
aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300
tcatcattaa caaatgcaac tacggaagaa actccggtaa ctggtgaagc tactacggca 360
acgaatcaag ctaatacacc ggcaacaact caatcaagca atacaaatgc ggaggaatta 420
gtgaatcaaa caagtaatga aacgactttct aatgatacta atacagtatc atctgtaaat 480
tcacctcaaa attctacaaa tgcggaaaat gtttcaacaa cgcaagatac ttcaactgaa 540
gcaacacctt caaacaatga atcagctcca cagagtacag atgcaagtaa taaagattta 600
gttaatcaag cggttaatac aagtgcgcct agaatgagag catttagttt agcggcagta 660
gctgcagatg cacctgcagc tggcacagat attacgaatc agttgacaga tgttaaagtt 720
actattgact ctggtacgac tgtgtatccg caccaagcag gttatgtcaa actgaattat 780
ggttttcag tgcctaattc tgctgttaaa ggtgacacat tcaaaataac tgtacctaaa 840
gaattaaact taaatggtgt aacttcaact gctaaagtgc ctccaattat ggccggagat 900
caagtattgg caaatggtgt aatcgatagt gatggtaatg ttatttatac atttacagac 960
tatgttgata ctaaagaaaa tgtaacagct aatattacta tgccagctta tattgaccct 1020
gaaaatgtta caaagacagg taatgtaaca ttgacaactg gcataggtag tacaacagca 1080
aacaaaacag tattagtaga ttatgaaaaa tatggtaagt tttataactt atctattaaa 1140
ggtacaattg accaaatcga taaaacaaat aatacgtatc gtcagacaat ttatgtcaat 1200
ccaagtggag ataacgttat tgcgccggtt ttaacaggta atttaaaacc caatacggat 1260
agtaatgcat taatagatca gcaaaataca agtattaaag tatataaagt agataatgca 1320
gctgatttat ctgaaagtta ctttgtaaat ccagaaaact ttgaggatgt cactaatagt 1380
gtgaatatta cattcccaaa tccaaatcaa tataaagtag agtttaatac gcctgatgat 1440
caaattacaa caccgtatat tgtagttgtt aatggtcata ttgatccgaa tagcaaaggt 1500
gatttagctt tacgttcaac tttatatggg tataactcga atataatttg gcgctctatg 1560
tcatgggaca acgaagtagc atttaataac ggatcaggtt ctggtgacgg tatcgataaa 1620
cctgttgtcc ctgaacaacc tgatgagcct ggtgaaattg aaccaattcc agag 1674

<210> 94
<211> 558
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 94

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

925

```
     50                  55                  60
Ala Pro Lys Thr Asp Asn 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 Leu Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro
            100                 105                 110
Val Thr Gly Glu Ala Thr Thr Ala Thr Asn Gln Ala Asn Thr Pro Ala
        115                 120                 125
Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln Thr
    130                 135                 140
Ser Asn Glu Thr Thr Ser Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val Asn
145                 150                 155                 160
Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln Asp
                165                 170                 175
Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln Ser
            180                 185                 190
Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Leu Val Asn Gln Ala Val Asn Thr Ser
        195                 200                 205
Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp Ala
    210                 215                 220
Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asp Val Lys Val
225                 230                 235                 240
Thr Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr Val
                245                 250                 255
Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly Asp
            260                 265                 270
Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val Thr
        275                 280                 285
Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu Ala
    290                 295                 300
Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr Asp
305                 310                 315                 320
Tyr Val Asp Thr Lys Glu Asn Val Thr Ala Asn Ile Thr Met Pro Ala
                325                 330                 335
Tyr Ile Asp Pro Glu Asn Val Thr Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu Thr
            340                 345                 350
Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp Tyr
        355                 360                 365
Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile Asp
    370                 375                 380
Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val Asn
385                 390                 395                 400
Pro Ser Gly Asp Asn Val Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu Lys
                405                 410                 415
Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser Ile
            420                 425                 430
Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser Tyr Phe
        435                 440                 445
Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile Thr
    450                 455                 460
Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro Asp Asp
465                 470                 475                 480
Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp Pro
                485                 490                 495
Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr Asn
            500                 505                 510
Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala Phe
        515                 520                 525
Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val Pro
    530                 535                 540
```

Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
545 550 555

<210> 95
<211> 1677
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 95

atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60
gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120
gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180
agcgttagtg ctgcacctaa aacagacgac acaaacgtga gtgatactaa aacatcgtca 240
aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatctag cacaacagga aacgacacaa 300
tcatcatcaa caaatgcaac tacggaagaa acgccggtaa ctggtgaagc tactactacg 360
acaacgaatc aagctaatac accggcaaca actcaatcaa gcaatacaaa tgcggaggaa 420
ttagtgaatc aaacaagtaa tgaaacgact tctaatgata ctaatacagt atcatctgta 480
aattcacctc aaaattctac aaatgcggaa aatgtttcaa caacgcaaga tacttcaact 540
gaagcaacac cttcaaacaa tgaatcagct ccacagagta cagatgcaag taataaagat 600
gtagttaatc aagcggttaa tacaagtgcg cctagaatga gagcatttag tttagcggca 660
gtagctgcag atgcaccggc agctggcaca gatattacga atcagttgac gaatgtgaca 720
gttggtattg actctggtac gactgtgtat ccgcaccaag caggttatgt caaactgaat 780
tatggttttt cagtgcctaa ttctgctgtt aaaggtgaca cattcaaaat aactgtacct 840
aaagaattaa acttaaatgg tgtaacttca actgctaaag tgccaccaat tatggctgga 900
gatcaagtat tggcaaatgg tgtaatcgat agtgatggta atgttattta tacatttaca 960
gactatgtaa atactaaaga tgatgttaaa gcaactttga ccatgcccgc ttatattgac 1020
cctgaaaatg ttacaaagac aggtaatgtg acattggcta ctggcatagg aaatacaaca 1080
gcaaacaaaa cagtattagt agattatgaa aaatatggta agttttataa cttatctatt 1140
aaaggtacaa ttgaccaaat cgataaaaca aataatacgt atcgtcagac aatttatgtc 1200
aatccaagtg gagataacgt tattgcgccg gttttaacag gtaatttaaa accaaatacg 1260
gatagtaatg cattaataga tcagcaaaat acaagtatta aagtatataa agtagataat 1320
gcagctgatt tatctgaaag ttactttgtg aatccagaaa actttgagga tgtcactaat 1380
agtgtgaata ttacattccc aaatccaaat caatataaag tagagtttaa tacgcctgat 1440
gatcaaatta caacaccgta tatagtagtt gttaatggtc atattgatcc gaatagcaaa 1500
ggtgatttag ctttacgttc aactttatat gggtataact cgaatataat ttggcgctct 1560
atgtcatggg acaacgaagt agcatttaat aacggatcag gttctggtga cggtatcgat 1620
aaacctgttg ttcctgaaca acctgatgag cctggtgaaa ttgaaccaat tccagag 1677

<210> 96
<211> 559
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 96

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

26

```
                    165                 170                 175
Asp Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln
                180                 185                 190
Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr
        195                 200                 205
Ser Ala 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 Asn Val Thr
225                 230                 235                 240
Val Gly 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
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 Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr Leu 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
Ala Thr Gly Ile Gly Asn Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp
        355                 360                 365
Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr 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 Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu
                405                 410                 415
Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser
            420                 425                 430
Ile Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser Tyr
        435                 440                 445
Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile
    450                 455                 460
Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro 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 Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr
            500                 505                 510
Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala
        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
545                 550                 555
<210> 97
<211> 1674
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus
<400> 97
atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca     60
gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt    120
gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt    180
agcgttagtg ctgcacctaa aacagacgac acaaacgtga gtgatactaa aacatcgtca    240
aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa    300
tcagcattaa caaatgcaac tacggaagaa actccgttaa ctggtgaagc tactacggca    360
acgaatcaag ctaatacacc ggcaacaact caatcaagca atacaaatgc ggaggaatta    420
```

gtgaatcaaa caagtaatga aacgacttct aatgatacta atacagtatc atctgtaaat 480
tcacctcaaa attctacaaa tgcggaaaat gtttcaacaa cgcaagatac ttcaactgaa 540
gcaacacctt caaacaatga atcagctcca cagagtacag atgcaagtaa taaagatgta 600
gttaatcaag cggttaatac aagtgcgcct agaatgagag catttagttt agcggcagta 660
gctgcagatg caccggcagc tggcacagat attacgaatc agttgacaga tgtgaaagtt 720
actattgact ctggtacgac tgtgtatccg caccaagcag gttatgtcaa actgaattat 780
ggtttttcag tgcctaattc tgctgttaaa ggtgacacat tcaaaataac tgtacctaaa 840
gaattaaact taaatggtgt aacttcaact gctaaagtgc ctccaattat ggccggagat 900
caagtattgg caaatggtgt aatcgatagt gatggtaatg ttatttatac atttacagac 960
tatgttgata ataaaaacga tgttaaagca acactaactg ttcctgcata cattgatcca 1020
gaaaatgtaa cgaaaacagg taatgtaaca ttgacaactg gcataggaac caatactgct 1080
agtaagacag ttttaatcga ctatgagaaa tatggacaat tccataattt atcaattaaa 1140
ggtacaattg atcaaatcga caaaacaaac aatacgtatc gtcaaacgat ttatgtcaat 1200
ccaagtggag acaatgttgt attaccagtg ttaactggta atctaattcc taagagtaat 1260
agtaatgctt taatagatgc caacaatact aatattaaag tttataaagt ggataatgct 1320
aatgatttat ctgaaagtta ttatgtgaat cctagcgatt ttgaagatgt aactaatcaa 1380
gttagaattt catttccaaa tgctaatcaa tacaaagtag aatttcctac ggacgatgac 1440
caaattacaa caccgtatat tgtagttgtt aatggccata ttgatcctgc tagtacaggt 1500
gatttagcac tacgttcgac attttatggt tatgattcta attttatatg gagatctatg 1560
tcatgggaca acgaagtagc atttaataac ggatcaggtt ctggtgacgg tatcgataaa 1620
ccagttgttc ctgaacaacc tgatgagcct ggtgaaattg aaccaattcc agag 1674

<210> 98
<211> 558
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 98

Met Asn Met Lys Lys Lys Glu Lys His Ala Ile Arg Lys Lys Ser Ile
1 5 10 15
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 Ala Leu Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro
100 105 110
Leu Thr Gly Glu Ala Thr Thr Ala Thr Asn Gln Ala Asn Thr Pro Ala
115 120 125
Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln Thr
130 135 140
Ser Asn Glu Thr Thr Ser Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val Asn
145 150 155 160
Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln Asp
165 170 175
Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln Ser
180 185 190
Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr Ser
195 200 205
Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp Ala
210 215 220
Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asp Val Lys Val
225 230 235 240
Thr Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr Val
245 250 255
Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly Asp
260 265 270
Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val Thr

275 280 285

Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu Ala
290 295 300

Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr Asp
305 310 315 320

Tyr Val Asp Asn Lys Asn Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Val Pro Ala
325 330 335

Tyr Ile Asp Pro Glu Asn Val Thr Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu Thr
340 345 350

Thr Gly Ile Gly Thr Asn Thr Ala Ser Lys Thr Val Leu Ile Asp Tyr
355 360 365

Glu Lys Tyr Gly Gln Phe His Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile Asp
370 375 380

Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val Asn
385 390 395 400

Pro Ser Gly Asp Asn Val Val Leu Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu Ile
405 410 415

Pro Lys Ser Asn Ser Asn Ala Leu Ile Asp Ala Asn Asn Thr Asn Ile
420 425 430

Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Asn Asp Leu Ser Glu Ser Tyr Tyr
435 440 445

Val Asn Pro Ser Asp Phe Glu Asp Val Thr Asn Gln Val Arg Ile Ser
450 455 460

Phe Pro Asn Ala Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Pro Thr Asp Asp Asp
465 470 475 480

Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Asn Gly His Ile Asp Pro
485 490 495

Ala Ser Thr Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Phe Tyr Gly Tyr Asp
500 505 510

Ser Asn Phe Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala Phe
515 520 525

Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val Pro
530 535 540

Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
545 550 555

<210> 99
<211> 1674
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 99

atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60
gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120
gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180
agcgttagtg ctgcacctaa aacagacgac acaaacgtga gtgatactaa aacatcgtca 240
aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacaaga aacgacacaa 300
tcagcattaa caaatgcaac tacggaagaa actccggtaa ctggtgaagc tactacggca 360
acgaatcaag ctaatacacc ggcaacaact caatcaagca atacaaatgc ggaggaatta 420
gtgaatcaaa caagtaatga aacgacttct aatgatacta atacagtatc atctgtaaat 480
tcacctcaaa attctacaaa tgcggaaaat gtttcaacaa cgcaagatac ttcaactgaa 540
gcaacacctt caaacaatga atcagctcca cagaatacag atgcaagtaa taaagatgta 600
gttaatcaag cggttaatac aagtgcgcct agaaagagag catttagttt agcggctgta 660
gctgcagatg caccggcagc tggcacagat attacgaatc agttgacaga tgtgaaagtt 720
actattgact ctggtacgac tgtgtatccg caccaagcag gttatgtcaa actgaattat 780
ggtttttcag tgcctaattc tgctgttaaa ggtgacacat tcaaaataac tgtacctaaa 840
gaattaaact taaatggtgt aacttcaact gctaaagcgc caccaattat ggctggagat 900
caagtattgg caaatggtgt aatcgatagt gatggtaatg ttatttatac atttacagac 960
tatgttgata ataaagaaaa tgtaacagct aatattacta tgccagctta tattgaccct 1020
gaaaatgtta caaagacagg taatgtgaca ttgacaactg gcataggaac caatactgct 1080
agtaagacag tattaatcga ctatgagaaa tatggacaat tccataattt atcaattaaa 1140
ggtacgattg atcaaatcga taaaacaaat aatacgtatc gccaaacaat ttatgtcaat 1200
ccaagcggag ataacgttgt gttacctgcc ttaacaggta atttaattcc taatacaaag 1260

agtaatgcgt taatagatgc aaaaaacact gatattaaag tttatagagt cgataatgct 1320
aatgatttat ctgaaagtta ttatgtgaat cctagcgatt ttgaagatgt aactaatcaa 1380
gttagaattt catttccaaa tgctaatcaa tacaaagtag aatttcctac ggacgatgac 1440
caaattacaa caccgtatat tgtagttgtt aatggccata ttgatcctgc tagtacaggt 1500
gatttagcac tacgttcgac attttatggt tatgattcta attttatatg gagatctatg 1560
tcatgggaca acgaagtagc atttaataac ggatcaggtt ctggtgacgg tatcgataaa 1620
ccagttgttc ctgaacaacc tgatgagcct ggtgaaattg aaccaattcc agag 1674

<210> 100
<211> 558
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 100

Met Asn Met Lys Lys Lys Glu Lys His Ala Ile Arg Lys Lys Ser Ile
1 5 10 15
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 Ala Leu Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro
100 105 110
Val Thr Gly Glu Ala Thr Thr Ala Thr Asn Gln Ala Asn Thr Pro Ala
115 120 125
Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln Thr
130 135 140
Ser Asn Glu Thr Thr Ser Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val Asn
145 150 155 160
Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln Asp
165 170 175
Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln Asn
180 185 190
Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr Ser
195 200 205
Ala Pro Arg Lys Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp Ala
210 215 220
Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asp Val Lys Val
225 230 235 240
Thr Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr Val
245 250 255
Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly Asp
260 265 270
Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val Thr
275 280 285
Ser Thr Ala Lys Ala Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu Ala
290 295 300
Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr Asp
305 310 315 320
Tyr Val Asp Asn Lys Glu Asn Val Thr Ala Asn Ile Thr Met Pro Ala
325 330 335
Tyr Ile Asp Pro Glu Asn Val Thr Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu Thr
340 345 350
Thr Gly Ile Gly Thr Asn Thr Ala Ser Lys Thr Val Leu Ile Asp Tyr
355 360 365
Glu Lys Tyr Gly Gln Phe His Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile Asp
370 375 380
Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val Asn

385 390 395 400
Pro Ser Gly Asp Asn Val Val Leu Pro Ala Leu Thr Gly Asn Leu Ile
405 410 415
Pro Asn Thr Lys Ser Asn Ala Leu Ile Asp Ala Lys Asn Thr Asp Ile
420 425 430
Lys Val Tyr Arg Val Asp Asn Ala Asn Asp Leu Ser Glu Ser Tyr Tyr
435 440 445
Val Asn Pro Ser Asp Phe Glu Asp Val Thr Asn Gln Val Arg Ile Ser
450 455 460
Phe Pro Asn Ala Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Pro Thr Asp Asp Asp
465 470 475 480
Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Asn Gly His Ile Asp Pro
485 490 495
Ala Ser Thr Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Phe Tyr Gly Tyr Asp
500 505 510
Ser Asn Phe Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala Phe
515 520 525
Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val Pro
530 535 540
Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
545 550 555

<210> 101
<211> 1677
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 101

atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60
gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120
gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180
agcgttagtg ctgcacctaa aacagacgac acaaacgtga gtgatactaa aacatcgtca 240
aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300
tcatcatcaa caaatgcaac tacggaagaa acgccggtaa ctggtgaagc tactactacg 360
acaacgaatc aagctaatac accggcaaca actcaatcaa gcaatacaaa tgcggaggaa 420
ttagtgaatc aaacaagtaa tgaaacgact tctaatgata ctaatacagt atcatctgta 480
aattcacctc aaaattctac aaatgcggaa aatgtttcaa caacgcaaga tacttcaact 540
gaagcaacac cttcaaacaa tgaatcagct ccacagagta cagatgcaag taataaagat 600
gtagttaatc aagcggttaa tacaagtgcg cctagaatga gagcatttag tttagcggca 660
gtagctgcag atgcaccggc agctggcaca gatattacga atcagttgac gaatgtgaca 720
gttggtattg actctggaga tacagtttat ccgcaccaag caggctatgt caaactgaat 780
tatggttttt cagtgcctaa ttctgctgtt aaaggtgaca cattcaaaat aactgtacct 840
aaagaattaa acttaaatgg tgtaacttca actgctaaag tgccaccaat tatggctgga 900
gatcaagtat tggcaaatgg tgtaatcgat agtgatggta atgttattta tacatttaca 960
gactatgtaa atactaaaga tgatgttaaa gcaactttga ccatgcccgc ttatattgac 1020
cctgaaaatg ttacaaagac aggtaatgtg acattggcta ctggcatagg aaatacaaca 1080
gcaaacaaaa cagtattagt agattatgaa aaatatggta agttttataa cttatctatt 1140
aaaggtacaa ttgaccaaat cgataaaaca aataatacgt atcgtcagac aatttatgtc 1200
aatccaagtg gagataacgt tattgcgccg gttttaacag gtaatttaaa accaaatacg 1260
gatagtaatg cattaataga tcagcaaaat acaagtatta aagtatataa agtagataat 1320
gcagctgatt tatctgaaag ttacttttgtg aatccagaaa actttgagga tgtcactaat 1380
agtgtgaata ttacattccc aaatccaaat caatataaag tagagtttaa tacgcctgat 1440
gatcaaatta caacaccgta tatagtagtt gttaatggtc atattgatcc gaatagcaaa 1500
ggtgatttag ctttacgttc aactttatat gggtatgact caaggtttgt atggagatct 1560
atgtcatggg acaacgaagt agcatttaat aacggatcag gttctggtga cggtatcgat 1620
aaaccagttg ttcctgaaca acctgatgag cctggtgaaa ttgaaccaat tccagag 1677

<210> 102
<211> 559
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 102

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

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
Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr
195 200 205
Ser Ala 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 Asn Val Thr
225 230 235 240
Val Gly Ile Asp Ser Gly Asp 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
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 Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr Leu 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
Ala Thr Gly Ile Gly Asn Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp
355 360 365
Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr 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 Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu
405 410 415
Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser
420 425 430
Ile Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser Tyr
435 440 445
Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile
450 455 460
Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro Asp
465 470 475 480
Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Asn Gly His Ile Asp
485 490 495
Pro Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr

```
                500                 505                 510
Asp Ser Arg Phe Val Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala
        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
545                 550                 555
<210> 103
<211> 1677
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus
<400> 103
atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca     60
gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt    120
gaaaatagtg ttacgcaatc cgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt    180
agcgttagtg ctgcacctaa aacagtcgac acaaacgtga gtgatactaa aacaacgtca    240
aacactaata gtggcgaaac aagtgtggcg caaaatccgg cacaacagga aacgacacaa    300
tcagcatcaa caaatgcaac tacggaagaa actccggcaa ctggtgaagc tactactacg    360
gcaacgaatc aagctaatac accggcaaca actcaatcaa gcaatacaaa tgcggaggaa    420
ttagtgaatc aaacaaataa tgaaacgact tctaatgata ctaatacagt atcatctgta    480
aattcacctc aaaattctac aaatgcggaa aatgtttcaa caacgcaaga tacttcaact    540
gaagcaacac cttcaaacaa tgaatcagct ccacagagta cagatgcaag taataaagat    600
gtagttaatc aagcggttaa tacaagtgcg cctagaatga gagcatttag tttagcggca    660
gtagctgcag atgcaccggc tgctggcaca gatattacga atcagttgac agatgtgaaa    720
gttactattg actctggtac gactgtgtat ccgcaccaag caggttatgt caaactgaat    780
tatggttttt cagtccctaa ttctgctgtt aaaggtgaca cattcaaaat aactgtacct    840
aaagaattaa acttaaatgg tgtaacttca actgctaagg tgccaccaat tatggccgga    900
gatcaagtat tggcaaatgg tgtaatcgat agtgatggta atgttattta tacatttaca    960
gactatgttg ataataaaga aaatgtaaca gctaatatta ctatgccagc ttatattgac   1020
cctgaaaatg ttacaaagac aggtaatgtg acattgacaa ctggcatagg aaccaatact   1080
gctagtaaga cagtattaat cgactatgag aaatatggac aattccataa tttatcaatt   1140
aaaggtacga ttgatcaaat cgataaaaca aataatacgt atcgccaaac aatttatgtc   1200
aatccaagcg gagataacgt tgtgttacct gccttaacag gtaatttaat tcctaataca   1260
aagagtaatg cgttaataga tgcaaaaaac actgatatta aagtttatag agtcgataat   1320
gctaatgatt tatctgaaag ttattatgtg aatcctagcg attttgaaga tgtaactaat   1380
caagttagaa tttcatttcc aaatgctaat caatacaaag tagaatttcc tacggacgat   1440
gaccaaatta caacaccgta tattgtagtt gttaatggcc atattgatcc tgctagtaca   1500
ggtgatttag cactacgttc gacattttat ggttatgatt ctaattttat atggagatct   1560
atgtcatggg acaacgaagt agcatttaat aacggatcag gctctggtga cggtatcgat   1620
aaaccagttg ttcctgaaca acctgatgag cctggtgaaa ttgaaccaat tccagag      1677
<210> 104
<211> 559
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus
<400> 104
Met Asn Met Lys Lys Lys Glu Lys His Ala Ile Arg Lys Lys Ser Ile
1               5                   10                  15
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 Val Asp Thr Asn Val Ser Asp Thr Lys Thr Thr Ser
65                  70                  75                  80
Asn Thr Asn Ser Gly Glu Thr Ser Val Ala Gln Asn Pro Ala Gln Gln
                85                  90                  95
Glu Thr Thr Gln Ser Ala Ser Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro
            100                 105                 110
Ala Thr Gly Glu Ala Thr Thr Thr Ala 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 Asn 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
Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr
195 200 205
Ser Ala 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
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
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
545 550 555

<210> 105
<211> 1677
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 105

atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60
gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120

gaaaatagtg ttacgcaatc cgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa taatccaagt 180
agcgttaacg ctgcacctaa aacagacaac acaaacgtga gtgatactaa aacaacgtca 240
aacactaata atagcgaaac gagtgtggca caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300
tcagcatcaa caaatgcaac tacggaagaa acaccggtaa ctggtgaagg tactactacg 360
gcaacgaatc aagctaatac accggcagca actcaatcaa acaatacaaa tgcggaggaa 420
ttagtgaatc aaacaagtaa tgaaacgact tctaatgata ctaatacagt atcatctgta 480
aattcacctc aaaattctac aaatgcggaa aatgtttcaa caacgcaaga cacttcaact 540
gaagcaacac cttcaaacaa tgaatcagct ccacagagta cagatgcaag taataaagat 600
gtagttagtc aagccgttaa tccaagtgcg cctagaatga gagcatttag tttagcggct 660
gtagctgcag atgcaccggc tgctggcaca gatattacga atcagttgac agatgttact 720
gttggtattg aatctggaga tacagtttat ccgcaccaag caggttatgt caaactgaat 780
tatggttttt ccgtgcctaa ttctgctgtt aaaggtgaca cattcaaaat aactgtacct 840
aaagaattaa acttaaatgg tgtaacttca actgctaaag ttcctccaat tatggctgga 900
gatcaagtat tagctaatgg tgtaatcgat agtgatggta atgttattta tacatttaca 960
gactatgtaa atactaaaga tgatgttaaa gcaacactaa ctgtgcctgc atacattgac 1020
cctgaatatg ttacacatac tggtaatgtg acattggcta ctggcatagg aaatacaaca 1080
gcaaacaaaa cagtattagt agattatgaa aaatatggta agttttataa cttatctatt 1140
aaaggtacaa ttgaccaagt cgataaaaca aataatacgt atcgtcagac aatttatgtc 1200
aatccaagtg gagataacgt tattgcaccg gttttaacag gtaatttaaa accaaatacg 1260
gatagtaatg cattaataga tcagcaaaat acaagtatta aagtatataa agtagataat 1320
gcagctgatt tatctgaaag ttactttgtg aatccagaaa actttgagga tgtcactaat 1380
agtgtaaata ttacattccc aaatccaaat caatataaag tagagtttaa tacgcctgat 1440
gatcaaatta caacaccgta tattgtagtt gttaatggtc atattgatcc gaatagcaaa 1500
ggtgatttag ctttacgttc aactttatat ggatataact caaatataat ttggcgctct 1560
atgtcatggg acaacgaagt agcatttaat aacggatcag gttctggtga cggtatcgat 1620
aaacctgttg ttcctgaaca acctgatgag ccgggtgaaa ttgaaccaat tccagag 1677

<210> 106
<211> 559
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 106

Met Asn Met Lys Lys Lys Glu Lys His Ala Ile Arg Lys Lys Ser Ile
1 5 10 15
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 Asn Pro Ser Ser Val Asn Ala
50 55 60
Ala Pro Lys Thr Asp Asn Thr Asn Val Ser Asp Thr Lys Thr Thr Ser
65 70 75 80
Asn Thr Asn Asn Ser Glu Thr Ser Val Ala Gln Asn Pro Ala Gln Gln
85 90 95
Glu Thr Thr Gln Ser Ala Ser Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro
100 105 110
Val Thr Gly Glu Gly Thr Thr Thr Ala Thr Asn Gln Ala Asn Thr Pro
115 120 125
Ala Ala Thr Gln Ser Asn 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
Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Ser Gln Ala Val Asn Pro
195 200 205
Ser Ala 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 Thr
225 230 235 240

Val Gly Ile Glu Ser Gly Asp 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
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 Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Val Pro
325 330 335
Ala Tyr Ile Asp Pro Glu Tyr Val Thr His Thr Gly Asn Val Thr Leu
340 345 350
Ala Thr Gly Ile Gly Asn Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp
355 360 365
Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile
370 375 380
Asp Gln Val Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val
385 390 395 400
Asn Pro Ser Gly Asp Asn Val Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu
405 410 415
Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser
420 425 430
Ile Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser Tyr
435 440 445
Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile
450 455 460
Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro 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 Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr
500 505 510
Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala
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
545 550 555

<210> 107
<211> 1677
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 107

atgaatatga agaaacaaga aaaacacgca attcgtaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60
gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120
gaaaatagta tgacacaaac ggaaaatacg agtaatgaga gcaaaagtaa tgatccaagt 180
agcgttaatg ctgcacctaa aacagacaac acaaacgtga gtgattctaa tacaacgaca 240
aacactaata gtgacgaaac gaatgtagcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300
tcagcatcaa caaatgcaac tacagaagaa acaccggtaa ctggtgaagt tactactacg 360
gcaacgaatc aagctaatac accggcaaca actcaatcaa gcaatacaaa tgcggaagaa 420
tcagtgaatc aaacaagtaa tgaaacgact tctaatgata ctaatacagt atcatctgta 480
aattcacctc aaaattctac aaatgcggaa aatgtttcaa caacgcaaga catttcaact 540
gaagcaacac cttcaaacaa tgaatcagct ccacagagta cagatgcaag taataaagat 600
gtagttaatc aagcggttaa tacaagtgcg cctagaatga gagcatttag tttagcggct 660
gtagctgcag atgcaccggc tgctggcaaa gatattacga atcagttgac gaatgtgaca 720
gttggtattg actctggaga tacagtttat ccgcaccaag caggctatgt caaactgaat 780
tatgggttct cagtaccaaa tgaggctgtt caaggtgaca cattcaaaat aactgtgccc 840
aaagaattaa acttaaatgg tgtaacttca actgctaaag tgccaccaat tatggccgga 900
gatcaagtat tggcaaatgg tgtaatcgat agtgatggta atgttattta tacatttaca 960

gactatgtaa atactaaaga tgatgttaaa gcaactttga ccatgcccgc ttatattgac 1020
cctgaaaatg ttacaaagac aggtaatgtg acattggcta ctggcatagg tagtacaaca 1080
gcaaacaaaa cagtattagt agattatgaa aaatatggta agttttataa cttatctatt 1140
aaaggtacaa ttgaccaaat cgataaaaca aataatacgt atcgtcagac aatttatgtc 1200
aatccaagtg gagataacgt tattgcgccg gttttaacag gtaatttaaa accaaatacg 1260
gatagtaatg cattaataga tgcacaaaat actagtatta aagtatataa agttgataat 1320
gcatcagact tgtctgaaag ttattatgtg aatccagata actttgaaga tgtcactgat 1380
agtgtgaata ttacattccc aaatccaaat caatataaag tagagttcaa tacgcctgat 1440
gatcaaataa caacaccata tattgtagtt gttaatgggc atattgatcc taatagtaaa 1500
ggtgatttag ctttacgttc aactttatat ggatataatt cgaatataat ttggcgatca 1560
atgtcatggg ataatgaagt agcatttaat aacggatcag gttttggtga cggtatcgat 1620
aaacctgttg ttcctgaaca acctgatgag ccgggtgaaa ttgaaccaat tccagag 1677

<210> 108
<211> 559
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 108

Met Asn Met Lys Lys Gln Glu Lys His Ala Ile Arg Lys Lys Ser Ile
1 5 10 15
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 Met Thr Gln Thr Glu
35 40 45
Asn Thr Ser Asn Glu Ser Lys Ser Asn Asp Pro Ser Ser Val Asn Ala
50 55 60
Ala Pro Lys Thr Asp Asn Thr Asn Val Ser Asp Ser Asn Thr Thr Thr
65 70 75 80
Asn Thr Asn Ser Asp Glu Thr Asn Val Ala Gln Asn Pro Ala Gln Gln
85 90 95
Glu Thr Thr Gln Ser Ala Ser Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro
100 105 110
Val Thr Gly Glu Val Thr Thr Thr Ala Thr Asn Gln Ala Asn Thr Pro
115 120 125
Ala Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Ser 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 Ile Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln
180 185 190
Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr
195 200 205
Ser Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp
210 215 220
Ala Pro Ala Ala Gly Lys Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asn Val Thr
225 230 235 240
Val Gly Ile Asp Ser Gly Asp Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr
245 250 255
Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Glu Ala Val Gln Gly
260 265 270
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 Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr Leu 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

Ala Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp
355 360 365
Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr 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 Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu
405 410 415
Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Ala Gln Asn Thr Ser
420 425 430
Ile Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ser Asp Leu Ser Glu Ser Tyr
435 440 445
Tyr Val Asn Pro Asp Asn Phe Glu Asp Val Thr Asp Ser Val Asn Ile
450 455 460
Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro 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 Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr
500 505 510
Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala
515 520 525
Phe Asn Asn Gly Ser Gly Phe 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
545 550 555

<210> 109
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético
<400> 109
cacaaaattt acgaatagaa agaaacgag 29

<210> 110
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético
<400> 110
aaaatattgg agataccaat attttaggtt g 31

<210> 111
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético
<400> 111
tttcttggat ccggtactgg tggtaaacaa agcagtg 37

<210> 112
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético
<400> 112
tttcttgcat gcttatttca tgcttccgtg tacagtttc 39

<210> 113
<211> 34
<212> ADN

<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético
<400> 113
tttcttccat gggtactggt ggtaaacaaa gcag 34
<210> 114
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético
<400> 114
tttcttgctc agcattattt catgcttccg tgtacag 37
<210> 115
<211> 309
<212> PRT
<213> *Staphylococcus epidermidis*
<400> 115

Val	Lys	Lys	Ile	Leu	Ala	Leu	Ala	Ile	Ala	Phe	Leu	Ile	Ile	Leu	Ala
1				5					10					15	
Ala	Cys	Gly	Asn	His	Ser	Asn	His	Glu	His	His	Ser	His	Glu	Gly	Lys
			20					25					30		
Leu	Lys	Val	Val	Thr	Thr	Asn	Ser	Ile	Leu	Tyr	Asp	Met	Val	Lys	Arg
		35					40					45			
Val	Gly	Gly	Asn	Lys	Val	Asp	Val	His	Ser	Ile	Val	Pro	Val	Gly	Gln
	50					55					60				
Asp	Pro	His	Glu	Tyr	Glu	Val	Lys	Pro	Lys	Asp	Ile	Lys	Ala	Leu	Thr
65					70					75					80
Asp	Ala	Asp	Val	Val	Phe	Tyr	Asn	Gly	Leu	Asn	Leu	Glu	Thr	Gly	Asn
				85					90					95	
Gly	Trp	Phe	Glu	Lys	Ala	Leu	Asp	Gln	Ala	Gly	Lys	Ser	Thr	Lys	Asp
			100					105					110		
Lys	Asn	Val	Ile	Ala	Ala	Ser	Asn	Asn	Val	Lys	Pro	Ile	Tyr	Leu	Asn
		115					120					125			
Gly	Glu	Glu	Gly	Asn	Lys	Asn	Lys	Gln	Asp	Pro	His	Ala	Trp	Leu	Ser
	130					135					140				
Leu	Glu	Asn	Gly	Ile	Lys	Tyr	Val	Lys	Thr	Ile	Gln	Lys	Ser	Leu	Glu
145					150					155					160
His	His	Asp	Lys	Lys	Asp	Lys	Ser	Thr	Tyr	Glu	Lys	Gln	Gly	Asn	Ala
				165					170					175	
Tyr	Ile	Ser	Lys	Leu	Glu	Glu	Leu	Asn	Lys	Asp	Ser	Lys	Asn	Lys	Phe
			180					185					190		
Asp	Asp	Ile	Pro	Lys	Asn	Gln	Arg	Ala	Met	Met	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala
		195					200					205			
Phe	Lys	Tyr	Phe	Ala	Gln	Gln	Phe	Asp	Val	Lys	Pro	Gly	Tyr	Ile	Trp
	210					215					220				
Glu	Ile	Asn	Thr	Glu	Lys	Gln	Gly	Thr	Pro	Gly	Gln	Met	Lys	Gln	Ala
225					230					235					240
Ile	Lys	Phe	Val	Lys	Asp	Asn	His	Leu	Lys	His	Leu	Leu	Val	Glu	Thr
				245					250					255	
Ser	Val	Asp	Lys	Lys	Ala	Met	Gln	Ser	Leu	Ser	Glu	Glu	Thr	Lys	Lys
			260					265					270		
Asp	Ile	Tyr	Gly	Glu	Val	Phe	Thr	Asp	Ser	Ile	Gly	Lys	Ala	Gly	Thr
		275					280					285			
Lys	Gly	Asp	Ser	Tyr	Tyr	Lys	Met	Met	Lys	Ser	Asn	Ile	Asp	Thr	Ile
	290					295					300				
His	Gly	Ser	Met	Lys											
305															

<210> 116
<211> 930
<212> ADN

<213> *Staphylococcus epidermidis*
<400> 116
gtgaaaaaaa ttctcgcttt agcaatagca tttttaatta tccttgccgc atgtgggaat 60
cacagtaacc atgaacatca ctcacatgaa ggaaaattaa aagttgtaac tacaaactct 120
attctctatg acatggttaa acgtgtcggt ggaaataagg tcgatgttca tagcatcgtt 180
ccagtaggac aagatccaca tgaatatgag gttaaaccta aagatattaa agcattaaca 240
gatgctgacg ttgtatttta taatggttta aacctagaaa ctggaaatgg ttggtttgaa 300
aaagcacttg accaagcagg aaaatcaaca aaagataaaa atgtgatagc agcatcaaat 360
aatgttaaac caatatactt aaatggtgag gaaggtaaca aaaacaaaca agatccacat 420
gcatggttaa gtttagagaa tggaattaaa tacgtaaaaa caatacaaaa atcactagaa 480
catcatgata aaaaagataa gtctacatat gaaaaacaag ggaatgcata tatatcaaaa 540
ttagaagaac ttaataaaga tagtaaaaat aaatttgatg acatacccaa aaatcaacgt 600
gccatgatga caagtgaagg tgcatttaaa tattttgctc aacaattcga tgttaaacca 660
ggttatattt gggagataaa cacagaaaaa caaggtacac ctggtcaaat gaaacaagcc 720
attaaatttg ttaaagataa tcatttaaaa catttattag tcgaaacaag cgtagataaa 780
aaagctatgc aaagtttatc agaagaaact aagaaagata tttatggtga agtatttacc 840
gactctatag gtaaggcagg tactaaaggt gactcatact ataaaatgat gaaatctaat 900
attgatacaa tacatggtag tatgaaataa 930
<210> 117
<211> 510
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 117
Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Ala Ser Glu Gln Ser
1 5 10 15
Asn Asp Thr Thr Gln Ser Ser Lys Asn Asn Ala Ser Ala Asp Ser Glu
20 25 30
Lys Asn Asn Met Ile Glu Thr Pro Gln Leu Asn Thr Thr Ala Asn Asp
35 40 45
Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn Val Asp Ser Thr
50 55 60
Thr Lys Pro Met Ser Thr Gln Thr Ser Asn Thr Thr Thr Thr Glu Pro
65 70 75 80
Ala Ser Thr Asn Glu Thr Pro Gln Pro Thr Ala Ile Lys Asn Gln Ala
85 90 95
Thr Ala Ala Lys Met Gln Asp Gln Thr Val Pro Gln Glu Ala Asn Ser
100 105 110
Gln Val Asp Asn Lys Thr Thr Asn Asp Ala Asn Ser Ile Ala Thr Asn
115 120 125
Ser Glu Leu Lys Asn Ser Gln Thr Leu Asp Leu Pro Gln Ser Ser Pro
130 135 140
Gln Thr Ile Ser Asn Ala Gln Gly Thr Ser Lys Pro Ser Val Arg Thr
145 150 155 160
Arg Ala Val Arg Ser Leu Ala Val Ala Glu Pro Val Val Asn Ala Ala
165 170 175
Asp Ala Lys Gly Thr Asn Val Asn Asp Lys Val Thr Ala Ser Asn Phe
180 185 190
Lys Leu Glu Lys Thr Thr Phe Asp Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Phe
195 200 205
Met Ala Ala Asn Phe Thr Val Thr Asp Lys Val Lys Ser Gly Asp Tyr
210 215 220
Phe Thr Ala Lys Leu Pro Asp Ser Leu Thr Gly Asn Gly Asp Val Asp
225 230 235 240
Tyr Ser Asn Ser Asn Asn Thr Met Pro Ile Ala Asp Ile Lys Ser Thr
245 250 255
Asn Gly Asp Val Val Ala Lys Ala Thr Tyr Asp Ile Leu Thr Lys Thr
260 265 270
Tyr Thr Phe Val Phe Thr Asp Tyr Val Asn Asn Lys Glu Asn Ile Asn
275 280 285
Gly Gln Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
290 295 300

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

<210> 118
<211> 1533
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 118

atggctagca tgactggtgg acagcaaatg ggtgcttcag aacaatcgaa cgatacaacg 60
caatcttcga aaaataatgc aagtgcagat tccgaaaaaa acaatatgat agaaacacct 120
caattaaata caacggctaa tgatacatct gatattagtg caaacacaaa cagtgcgaat 180
gtagatagca caacaaaacc aatgtctaca caaacgagca ataccactac aacagagcca 240
gcttcaacaa atgaaacacc tcaaccgacg gcaattaaaa atcaagcaac tgctgcaaaa 300
atgcaagatc aaactgttcc tcaagaagca aattctcaag tagataataa aacaacgaat 360
gatgctaata gcatagcaac aaacagtgag cttaaaaatt ctcaaacatt agatttacca 420
caatcatcac cacaaacgat ttccaatgcg caaggaacta gtaaaccaag tgttagaacg 480
agagctgtac gtagtttagc tgttgctgaa ccggtagtaa atgctgctga tgctaaaggt 540
acaaatgtaa atgataaagt tacggcaagt aatttcaagt tagaaaagac tacatttgac 600
cctaatcaaa gtggtaacac atttatggcg gcaaatttta cagtgacaga taaagtgaaa 660
tcaggggatt attttacagc gaagttacca gatagtttaa ctggtaatgg agacgtggat 720
tatttctaatt caaataatac gatgccaatt gcagacatta aaagtacgaa tggcgatgtt 780
gtagctaaag caacatatga tatcttgact aagacgtata catttgtctt tacagattat 840
gtaaataata aagaaaatat taacggacaa ttttcattac ctttatttac agaccgagca 900
aaggcaccta aatcaggaac atatgatgcg aatattaata ttgcggatga aatgtttaat 960
aataaaatta cttataacta tagttcgcca attgcaggaa ttgataaacc aaatggcgcg 1020
aacatttctt ctcaaattat tggtgtagat acagcttcag gtcaaaacac atacaagcaa 1080
acagtatttg ttaaccctaa gcaacgagtt ttaggtaata cgtgggtgta tattaaaggc 1140
taccaagata aaatcgaaga aagtagcggt aaagtaagtg ctacagatac aaaactgaga 1200
atttttgaag tgaatgatac atctaaatta tcagatagct actatgcaga tccaaatgac 1260
tctaacctta aagaagtaac agaccaattt aaaaatagaa tctattatga gcatccaaat 1320
gtagctagta ttaaatttgg tgatattact aaaacatatg tagtattagt agaagggcat 1380
tacgacaata caggtaagaa cttaaaaact caggttattc aagaaaatgt tgatcctgta 1440
acaaatagag actacagtat tttcggttgg aataatgaga atgttgtacg ttatggtggt 1500
ggaagtgctg atggtgattc agcagtaaat taa 1533

<210> 119
<211> 292
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 119
Met Gly Thr Gly Gly Lys Gln Ser Ser Asp Lys Ser Asn Gly Lys Leu
1 5 10 15
Lys Val Val Thr Thr Asn Ser Ile Leu Tyr Asp Met Ala Lys Asn Val
20 25 30
Gly Gly Asp Asn Val Asp Ile His Ser Ile Val Pro Val Gly Gln Asp
35 40 45
Pro His Glu Tyr Glu Val Lys Pro Lys Asp Ile Lys Lys Leu Thr Asp
50 55 60
Ala Asp Val Ile Leu Tyr Asn Gly Leu Asn Leu Glu Thr Gly Asn Gly
65 70 75 80
Trp Phe Glu Lys Ala Leu Glu Gln Ala Gly Lys Ser Leu Lys Asp Lys
85 90 95
Lys Val Ile Ala Val Ser Lys Asp Val Lys Pro Ile Tyr Leu Asn Gly
100 105 110
Glu Glu Gly Asn Lys Asp Lys Gln Asp Pro His Ala Trp Leu Ser Leu
115 120 125
Asp Asn Gly Ile Lys Tyr Val Lys Thr Ile Gln Gln Thr Phe Ile Asp
130 135 140
Asn Asp Lys Lys His Lys Ala Asp Tyr Glu Lys Gln Gly Asn Lys Tyr
145 150 155 160
Ile Ala Gln Leu Glu Lys Leu Asn Asn Asp Ser Lys Asp Lys Phe Asn
165 170 175
Asp Ile Pro Lys Glu Gln Arg Ala Met Ile Thr Ser Glu Gly Ala Phe
180 185 190
Lys Tyr Phe Ser Lys Gln Tyr Gly Ile Thr Pro Gly Tyr Ile Trp Glu
195 200 205
Ile Asn Thr Glu Lys Gln Gly Thr Pro Glu Gln Met Arg Gln Ala Ile
210 215 220
Glu Phe Val Lys Lys His Lys Leu Lys His Leu Leu Val Glu Thr Ser
225 230 235 240
Val Asp Lys Lys Ala Met Glu Ser Leu Ser Glu Glu Thr Lys Lys Asp
245 250 255
Ile Phe Gly Glu Val Tyr Thr Asp Ser Ile Gly Lys Glu Gly Thr Lys
260 265 270
Gly Asp Ser Tyr Tyr Lys Met Met Lys Ser Asn Ile Glu Thr Val His
275 280 285
Gly Ser Met Lys
290
<210> 120
<211> 879
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 120
atgggtactg gtggtaaaca aagcagtgat aagtcaaatg gcaaattaaa agtagtaacg 60
acgaattcaa ttttatatga tatggctaaa aatgttggtg gagacaacgt cgatattcat 120
agtattgtac ctgttggtca agatcctcat gaatatgaag ttaaacctaa agatattaaa 180
aagttaactg acgctgacgt tattttatac aacggattaa atttagagac tggtaacggt 240
tggtttgaaa aagccttaga acaggctggt aaatcattaa aagataaaaa agttatcgca 300
gtatcaaaag atgttaaacc tatctattta aacggtgaag aaggcaacaa agataaacaa 360
gatccacacg catggttaag tttagataat ggtattaaat acgtaaaaac aattcaacaa 420
acatttatcg ataacgacaa aaaacataaa gcagattatg aaaagcaagg taacaaatac 480
attgctcaat tggaaaaatt aaataatgac agtaaagaca aatttaatga cattccaaaa 540
gaacaacgtg ccatgattac aagtgaaggt gccttcaagt acttctcaaa acaatacggt 600
attacaccag gttatatttg ggaaattaac actgaaaaac aaggtacacc tgaacaaatg 660
agacaagcta ttgagtttgt taaaaagcac aaattaaaac acttattagt agaaacaagt 720
gttgataaga aagcaatgga aagtttatct gaagaaacga agaaagatat ctttggtgaa 780
gtgtacacag attcaatcgg taaagaaggc actaaaggtg actcttacta caaaatgatg 840
aaatcaaata ttgaaactgt acacggaagc atgaaataa 879
<210> 121
<211> 292

<212> PRT
<213> *Staphylococcus epidermidis*
<400> 121

```
Met Gly Asn His Ser Asn His Glu His His Ser His Glu Gly Lys Leu
1               5                  10                  15
Lys Val Val Thr Thr Asn Ser Ile Leu Tyr Asp Met Val Lys Arg Val
            20                  25                  30
Gly Gly Asn Lys Val Asp Val His Ser Ile Val Pro Val Gly Gln Asp
        35                  40                  45
Pro His Glu Tyr Glu Val Lys Pro Lys Asp Ile Lys Ala Leu Thr Asp
    50                  55                  60
Ala Asp Val Val Phe Tyr Asn Gly Leu Asn Leu Glu Thr Gly Asn Gly
65                  70                  75                  80
Trp Phe Glu Lys Ala Leu Asp Gln Ala Gly Lys Ser Thr Lys Asp Lys
                85                  90                  95
Asn Val Ile Ala Ala Ser Asn Asn Val Lys Pro Ile Tyr Leu Asn Gly
            100                 105                 110
Glu Glu Gly Asn Lys Asn Lys Gln Asp Pro His Ala Trp Leu Ser Leu
        115                 120                 125
Glu Asn Gly Ile Lys Tyr Val Lys Thr Ile Gln Lys Ser Leu Glu His
    130                 135                 140
His Asp Lys Lys Asp Lys Ser Thr Tyr Glu Lys Gln Gly Asn Ala Tyr
145                 150                 155                 160
Ile Ser Lys Leu Glu Glu Leu Asn Lys Asp Ser Lys Asn Lys Phe Asp
                165                 170                 175
Asp Ile Pro Lys Asn Gln Arg Ala Met Met Thr Ser Glu Gly Ala Phe
            180                 185                 190
Lys Tyr Phe Ala Gln Gln Phe Asp Val Lys Pro Gly Tyr Ile Trp Glu
        195                 200                 205
Ile Asn Thr Glu Lys Gln Gly Thr Pro Gly Gln Met Lys Gln Ala Ile
    210                 215                 220
Lys Phe Val Lys Asp Asn His Leu Lys His Leu Leu Val Glu Thr Ser
225                 230                 235                 240
Val Asp Lys Lys Ala Met Gln Ser Leu Ser Glu Glu Thr Lys Lys Asp
                245                 250                 255
Ile Tyr Gly Glu Val Phe Thr Asp Ser Ile Gly Lys Glu Gly Thr Lys
            260                 265                 270
Gly Asp Ser Tyr Tyr Lys Met Met Lys Ser Asn Ile Asp Thr Ile His
        275                 280                 285
Gly Ser Met Lys
    290
```

<210> 122
<211> 879
<212> ADN
<213> *Staphylococcus epidermidis*
<400> 122

```
atggggaatc acagtaacca tgaacatcac tcacatgaag gaaaattaaa agttgtaact     60
acaaactcta ttctctatga catggttaaa cgtgtcggtg gaaataaggt cgatgttcat    120
agcatcgttc cagtaggaca agatccacat gaatatgagg ttaaacctaa agatattaaa    180
gcattaacag atgctgacgt tgtatttttat aatggtttaa acctagaaac tggaaatggt    240
tggtttgaaa aagcacttga ccaagcagga aaatcaacaa aagataaaaa tgtgatagca    300
gcatcaaata atgttaaacc aatatactta aatggtgagg aaggtaacaa aaacaaacaa    360
gatccacatg catggttaag tttagagaat ggaattaaat acgtaaaaac aatacaaaaa    420
tcactagaac atcatgataa aaaagataag tctacatatg aaaaacaagg gaatgcatat    480
atatcaaaat tagaagaact taataaagat agtaaaaata aatttgatga catacccaaa    540
aatcaacgtg ccatgatgac aagtgaaggt gcatttaaat attttgctca acaattcgat    600
gttaaaccag gttatatttg ggagataaac acagaaaaac aaggtacacc tggtcaaatg    660
aaacaagcca ttaaatttgt taaagataat catttaaaac atttattagt cgaaacaagc    720
gtagataaaa aagctatgca aagtttatca gaagaaacta agaaagatat ttatggtgaa    780
gtatttaccg actctatagg taaggaaggt actaaaggtg actcatacta taaaatgatg    840
aaatctaata ttgatacaat acatggtagt atgaaataa                           879
```

<210> 123
<211> 531
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 123

```
Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Ser Glu Asn Ser Val
1               5                  10                  15
Thr Gln Ser Asp Ser Ala Ser Asn Glu Ser Lys Ser Asn Asp Ser Ser
            20                  25                  30
Ser Val Ser Ala Ala Pro Lys Thr Asp Asp Thr Asn Val Ser Asp Thr
        35                  40                  45
Lys Thr Ser Ser Asn Thr Asn Asn Gly Glu Thr Ser Val Ala Gln Asn
    50                  55                  60
Pro Ala Gln Gln Glu Thr Thr Gln Ser Ser Ser Thr Asn Ala Thr Thr
65                  70                  75                  80
Glu Glu Thr Pro Val Thr Gly Glu Ala Thr Thr Thr Thr Thr Asn Gln
                85                  90                  95
Ala Asn Thr Pro Ala Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu
            100                 105                 110
Leu Val Asn Gln Thr Ser Asn Glu Thr Thr Phe Asn Asp Thr Asn Thr
        115                 120                 125
Val Ser Ser Val Asn Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val
    130                 135                 140
Ser Thr Thr Gln Asp Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu
145                 150                 155                 160
Ser Ala Pro Gln Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln
                165                 170                 175
Ala Val Asn Thr Ser Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala
            180                 185                 190
Val Ala Ala Asp Ala Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu
        195                 200                 205
Thr Asn Val Thr Val Gly Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His
    210                 215                 220
Gln Ala Gly Tyr Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser
225                 230                 235                 240
Ala Val Lys Gly Asp Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn
                245                 250                 255
Leu Asn Gly Val Thr Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly
            260                 265                 270
Asp Gln Val Leu Ala Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile
        275                 280                 285
Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Val Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr
    290                 295                 300
Leu Thr Met Pro Ala Ala Ile Asp Pro Glu Asn Val Lys Lys Thr Gly
305                 310                 315                 320
Asn Val Thr Leu Ala Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys Thr
                325                 330                 335
Val Leu Val Asp Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr Asn Leu Ser Ile
            340                 345                 350
Lys Gly Thr Ile Asp Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln
        355                 360                 365
Thr Ile Tyr Val Asn Pro Ser Gly Asp Asn Val Ile Ala Pro Val Leu
    370                 375                 380
Thr Gly Asn Leu Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln
385                 390                 395                 400
Gln Asn Thr Ser Ile Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp Leu
                405                 410                 415
Ser Glu Ser Tyr Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn
            420                 425                 430
Ser Val Asn Ile Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe
        435                 440                 445
```

Asn Thr Pro Asp Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn
450 455 460
Gly His Ile Asp Pro Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr
465 470 475 480
Leu Tyr Gly Tyr Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp
485 490 495
Asn Glu Val Ala Phe Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp
500 505 510
Lys Pro Val Val Pro Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro
515 520 525
Ile Pro Glu
530

<210> 124
<211> 1596
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 124

atggctagca tgactggtgg acagcaaatg ggtagtgaaa atagtgttac gcaatctgat 60
agcgcaagta acgaaagcaa aagtaatgat tcaagtagcg ttagtgctgc acctaaaaca 120
gacgacacaa acgtgagtga tactaaaaca tcgtcaaaca ctaataatgg cgaaacgagt 180
gtggcgcaaa atccagcaca acaggaaacg acacaatcat catcaacaaa tgcaactacg 240
gaagaaacgc cggtaactgg tgaagctact actacgacaa cgaatcaagc taatacaccg 300
gcaacaactc aatcaagcaa tacaaatgct gaagaattag tgaatcaaac aagtaatgaa 360
acgactttta atgatactaa tacagtatca tctgtaaatt cacctcaaaa ttctacaaat 420
gcggaaaatg tttcaacaac gcaagatact tcaactgaag caacaccttc aaacaatgaa 480
tcagctccac agagtacaga tgcaagtaat aaagatgtag ttaatcaagc ggttaataca 540
agtgcgccta gaatgagagc atttagttta gcggcagtag ctgcagatgc accggcagct 600
ggcacagata ttacgaatca gttgacgaat gtgacagttg gtattgactc tggtacgact 660
gtgtatccac accaagcagg ttatgtcaaa ctgaattatg gtttttcagt gcctaatttct 720
gctgttaaag gtgacacatt caaaataact gtacctaaag aattaaactt aaatggtgta 780
acttcaactg ctaaagtgcc accaattatg gctggagatc aagtattggc aaatggtgta 840
atcgatagtg atggtaatgt tatttataca tttacagact atgtaaatac taaagatgat 900
gtaaaagcaa ctttgaccat gcccgctgct attgaccctg aaaatgttaa aaagacaggt 960
aatgtgacat tggctactgg cataggtagt acaacagcaa acaaaacagt attagtagat 1020
tatgaaaaat atggtaagtt ttataactta tctattaaag gtacaattga ccaaatcgat 1080
aaaacaaata atacgtatcg tcagacaatt tatgtcaatc caagtggaga taacgttatt 1140
gcgccggttt taacaggtaa tttaaaacca aatacggata gtaatgcatt aatagatcag 1200
caaaatacaa gtattaaagt atataaagta gataatgcag ctgatttatc tgaaagttac 1260
tttgtgaatc cagaaaactt tgaggatgtc actaatagtg tgaatattac attcccaaat 1320
ccaaatcaat ataaagtaga gtttaatacg cctgatgatc aaattacaac accgtatata 1380
gtagttgtta atggtcatat tgatccgaat agcaaaggtg atttagcttt acgttcaact 1440
ttatatgggt ataactcgaa tataatttgg cgctctatgt catgggacaa cgaagtagca 1500
tttaataacg gatcaggttc tggtgacggt atcgataaac cagttgttcc tgaacaacct 1560
gatgagcctg gtgaaattga accaattcca gagtag 1596

<210> 125
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Cualquier aminoácido
<400> 125
Leu Pro Xaa Thr Gly
1 5

<210> 126
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
<400> 126
Thr Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Val Asp
1 5
<210> 127
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
<400> 127
Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser
1 5 10
<210> 128
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
<400> 128
Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Gly Ser
1 5 10
<210> 129
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
<400> 129
Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly
1 5 10
<210> 130
<211> 933
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 130
Met Asn Met Lys Lys Lys Glu Lys His Ala Ile Arg Lys Lys Ser Ile
1 5 10 15
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 Phe 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

236

Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr
195 200 205
Ser Ala 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 Asn Val Thr
225 230 235 240
Val Gly 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
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 Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Met Pro
325 330 335
Ala Tyr Ile Asp Pro Glu Asn Val Lys Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu
340 345 350
Ala Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp
355 360 365
Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr 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 Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu
405 410 415
Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser
420 425 430
Ile Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser Tyr
435 440 445
Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile
450 455 460
Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro 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 Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr
500 505 510
Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala
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 Asp
610 615 620
Asn Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp
625 630 635 640
Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp
645 650 655
Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp 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 Ser Asp
690 695 700

Ser Asp 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 Ser Asp
725 730 735

Ser Asp 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 Ser Ala
755 760 765

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

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

Ser Asp Ser Asp Ser Ala Ser Asp Ser Asp Ser Gly Ser Asp Ser Asp Ser Asp
835 840 845

Ser Ser Ser Asp Ser Asp Ser Glu Ser Asp Ser Asn Ser Asp Ser Glu Ser Glu
850 855 860

Ser Gly Ser Asn Asn Asn Val Val Pro Pro Asn Ser Pro Lys Asn Gly Thr Asn
865 870 875 880

Ala Ser Asn Lys Asn Glu Ala Lys Asp Ser Lys Glu Pro Leu Pro Asp Thr Gly
885 890 895

Ser Glu Asp Glu Ala Asn Thr Ser Leu Ile Trp Gly Leu Leu Ala Ser Ile Gly
900 905 910

Ser Leu Leu Leu Phe Arg Arg Lys Lys Glu Asn Lys Asp Lys Lys
915 920 925

930

<210> 131

<211> 2802

<212> ADN

<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 131

atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60

gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120

gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180

agcgttagtg ctgcacctaa aacagacgac acaaacgtga gtgatactaa aacatcgtca 240

aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300

tcatcatcaa caaatgcaac tacggaagaa acgccggtaa ctggtgaagc tactactacg 360

acaacgaatc aagctaatac accggcaaca actcaatcaa gcaatacaaa tgcggaggaa 420

ttagtgaatc aaacaagtaa tgaaacgact tttaatgata ctaatacagt atcatctgta 480

aattcacctc aaaattctac aaatgcggaa aatgtttcaa caacgcaaga tacttcaact 540

gaagcaacac cttcaaacaa tgaatcagct ccacagagta cagatgcaag taataaagat 600

gtagttaatc aagcggttaa tacaagtgcg cctagaatga gagcatttag tttagcggca 660

gtagctgcag atgcaccggc agctggcaca gatattacga atcagttgac gaatgtgaca 720

gttggtattg actctggtac gactgtgtat ccgcaccaag caggttatgt caaactgaat 780

tatggttttt cagtgcctaa ttctgctgtt aaaggtgaca cattcaaaat aactgtacct 840

aaagaattaa acttaaatgg tgtaacttca actgctaaag tgccaccaat tatggctgga 900

gatcaagtat tggcaaatgg tgtaatcgat agtgatggta atgttattta tacatttaca 960

gactatgtaa atactaaaga tgatgtaaaa gcaactttga ccatgcccgc ttatattgac 1020

cctgaaaatg ttaaaaagac aggtaatgtg acattggcta ctggcatagg tagtacaaca 1080

gcaaacaaaa cagtattagt agattatgaa aaatatggta agttttataa cttatctatt 1140

aaaggtacaa ttgaccaaat cgataaaaca aataatacgt atcgtcagac aatttatgtc 1200

aatccaagtg gagataacgt tattgcgccg gttttaacag gtaatttaaa accaaatacg 1260

gatagtaatg cattaataga tcagcaaaat acaagtatta aagtatataa agtagataat 1320

gcagctgatt tatctgaaag ttactttgtg aatccagaaa actttgagga tgtcactaat 1380

agtgtgaata ttacattccc aaatccaaat caatataaag tagagtttaa tacgcctgat 1440
gatcaaatta caacaccgta tatagtagtt gttaatggtc atattgatcc gaatagcaaa 1500
ggtgatttag ctttacgttc aactttatat gggtataact cgaatataat ttggcgctct 1560
atgtcatggg acaacgaagt agcatttaat aacggatcag gttctggtga cggtatcgat 1620
aaaccagttg ttcctgaaca acctgatgag cctggtgaaa ttgaaccaat tccagaggat 1680
tcagattctg acccaggttc agattctggc agcgattcta attcagatag cggttcagat 1740
tcgggtagtg attctacatc agatagtggt tcagattcag cgagtgattc agattcagca 1800
agtgattcag actcagcgag tgattcagat tcagcaagcg attccgactc agcgagcgat 1860
tccgactcag acaatgactc ggattcagat agcgattctg actcagacag tgactcagat 1920
tccgacagtg actcagattc agatagcgat tctgactcag acagtgactc agattcagat 1980
agcgattcag attcagatag cgattcagat tccgacagtg attccgactc agacagcgat 2040
tctgactccg acagtgattc cgactcagac agcgattcag attccgacag tgattccgac 2100
tcagatagcg attccgactc agatagcgac tcagattcag acagcgattc agattcagac 2160
agcgattcag attcagatag cgattcagat tccgacagtg actcagattc cgacagtgac 2220
tcggattcag atagcgattc agattccgac agtgactcag attccgacag tgactcagac 2280
tcagacagtg attcggattc agcgagtgat tcggattcag atagtgattc cgactccgac 2340
agtgactcgg attcagatag cgactcagac tcggatagcg actcggattc agatagcgat 2400
tcggactcag atagcgattc agaatcagac agcgattcag aatcagacag cgattcagat 2460
tcagacagcg actcagacag tgactcagat tcagatagtg actcggattc agcgagtgat 2520
tcagactcag gtagtgactc cgattcatca agtgattccg actcagaaag tgattcaaat 2580
agcgattccg agtcaggttc taacaataat gtagttccgc ctaattcacc taaaaatggt 2640
actaatgctt ctaataaaaa tgaggctaaa gatagtaaag aaccattacc agatacaggt 2700
tctgaagatg aagcaaatac gtcactaatt tggggattat tagcatcaat aggttcatta 2760
ctacttttca gaagaaaaaa agaaaataaa gataagaaat aa 2802

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica que comprende al menos tres componentes que se seleccionan del grupo que consiste en: un polipéptido de factor de aglutinación A (ClfA) de S. aureus aislado, un polipéptido de factor de aglutinación B (ClfB) de S. aureus aislado, una proteína MntC de S. aureus aislada, un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 5 conjugado con una proteína de portador, y un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 8 conjugado con una proteína de portador.

2. Una composición inmunogénica que comprende: un polipéptido de factor de aglutinación A (ClfA) de S. aureus aislado, un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 5 conjugado con una proteína de portador, y un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 8 conjugado con una proteína de portador.

3. La composición inmunogénica de la reivindicación 2, que además comprende un polipéptido de factor de aglutinación B (ClfB) de S. aureus aislado.

4. La composición inmunogénica de la reivindicación 2 o la reivindicación 3, que además comprende una proteína MntC de S. aureus aislada.

5. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el ClfA o el polipéptido de ClfB es un fragmento de polipéptido que comprende el dominio de unión a fibrinógeno de ClfA o ClfB.

6. La composición inmunogénica de la reivindicación 5, en la que el fragmento de polipéptido de ClfA o ClfB es un dominio de unión a fibrinógeno que comprende los dominios de ClfA o ClfB N1, N2 y N3.

7. La composición inmunogénica de la reivindicación 5, en la que el fragmento de polipéptido de ClfA o ClfB es un dominio de unión a fibrinógeno que comprende los dominios de ClfA o ClfB N2 y N3.

8. La composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 6, o 7, en la que el dominio de unión a fibrinógeno de ClfA se une a fibrinógeno a un nivel reducido en comparación con la unión que se observa a fibrinógeno con el dominio de unión a fibrinógeno nativo de ClfA.

9. La composición inmunogénica de la reivindicación 8, en la que el dominio de unión a fibrinógeno de ClfA se une a fibrinógeno a un nivel reducido en comparación con la unión que se observa a fibrinógeno con el dominio de unión a fibrinógeno nativo de ClfA a través de tener una sustitución de aminoácidos en uno o más de Tyr 338, Tyr 256, Pro 336, Lys 389, Ala 254 y Ile 387.

10. La composición inmunogénica de la reivindicación 9, en la que la sustitución de aminoácidos en uno o más de Tyr 338, Tyr 256, Pro 336, Lys 389, Ala 254 y Ile 387 es por Ala o Ser.

11. La composición inmunogénica de la reivindicación 10, en la que la Tyr 338 se sustituye por Ala.

12. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el ClfA, el ClfB, o MntC se produce de forma recombinante.

13. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que el polisacárido capsular de tipo 5 es un polisacárido capsular de alto peso molecular de entre 20 y 1.000 kDa.

14. La composición inmunogénica de la reivindicación 13, en la que el polisacárido capsular de alto peso molecular de tipo 5 tiene un peso molecular de entre 70 y 300 kDa.

15. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la que el polisacárido capsular de tipo 5 está entre un 10 % y un 100 % O-acetilado.

16. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la que el polisacárido capsular de tipo 5 está entre un 50 y un 100 % O-acetilado.

17. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la que el polisacárido capsular de tipo 5 está entre un 75 % y un 100 % O-acetilado.

18. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en la que el polisacárido capsular de tipo 8 es un polisacárido capsular de alto peso molecular de entre 20 y 1.000 kDa.

19. La composición inmunogénica de la reivindicación 18, en la que el polisacárido capsular de alto peso molecular de tipo 8 tiene un peso molecular de entre 70 y 300 kDa.

20. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en la que el polisacárido capsular de tipo 8 está entre un 10 % y un 100 % O-acetilado.

21. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en la que el polisacárido capsular de tipo 8 está entre un 50 y un 100 % O-acetilado.

22. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en la que el polisacárido capsular de tipo 8 está entre un 75 % y un 100 % O-acetilado.

23. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, en la que la proteína de portador es el toxoide C. diphtheriae CRM_{197}.

24. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4 a 23, en la que la proteína MntC de S. aureus es una proteína lipidada.

25. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4 a 23, en la que la proteína MntC de S. aureus no es una proteína lipidada.

26. Una composición inmunogénica que comprende: un polipéptido de factor de aglutinación B (ClfB) de S. aureus aislado, un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 5 conjugado con una proteína de portador, y un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 8 conjugado con una proteína de portador.

27. La composición inmunogénica de la reivindicación 23, que además comprende una proteína MntC de S. aureus aislada.

28. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 26 o 27, en la que el polipéptido de ClfB es un fragmento de polipéptido que comprende el dominio de unión a fibrinógeno de ClfB.

29. La composición inmunogénica de la reivindicación 28, en la que el fragmento de polipéptido de ClfB es un dominio de unión a fibrinógeno que comprende los dominios de ClfB N1, N2 y N3.

30. La composición inmunogénica de la reivindicación 28, en la que el fragmento de polipéptido de ClfB es un dominio de unión a fibrinógeno que comprende los dominios de ClfB N2 y N3.

31. La composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28, 29 y 30, en la que el dominio de unión a fibrinógeno de ClfB se une a fibrinógeno a un nivel reducido en comparación con la unión que se observa a fibrinógeno con el dominio de unión a fibrinógeno nativo de ClfB.

32. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 26 a 31, en la que el ClfB o la proteína MntC se produce de forma recombinante.

33. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 26 a 32, en la que el polisacárido capsular de tipo 5 es un polisacárido capsular de alto peso molecular de entre 20 y 1.000 kDa.

34. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 26 a 32, en la que el polisacárido capsular de alto peso molecular de tipo 5 tiene un peso molecular de entre 70 y 300 kDa.

35. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 26 a 34, en la que el polisacárido capsular de tipo 5 está entre un 10 % y un 100 % O-acetilado.

36. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 26 a 34, en la que el polisacárido capsular de tipo 5 está entre un 50 y un 100 % O-acetilado.

37. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 26 a 34, en la que el polisacárido capsular de tipo 5 está entre un 75 % y un 100 % O-acetilado.

38. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 26 a 37, en la que el polisacárido capsular de tipo 8 tiene un peso molecular de entre 20 y 1.000 kDa.

39. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 26 a 37, en la que el polisacárido capsular de tipo 8 tiene un peso molecular de entre 70 y 300 kDa.

40. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 26 a 39, en la que el polisacárido capsular de tipo 8 está entre un 10 % y un 100 % O-acetilado.

41. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 26 a 39, en la que el polisacárido capsular de tipo 8 está entre un 50 y un 100 % O-acetilado

42. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 26 a 39, en la que el polisacárido capsular de tipo 8 está entre un 75 % y un 100 % O-acetilado.

43. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 27 a 42, en la que la MntC de S. aureus es una proteína lipidada.

44. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 27 a 42, en la que la MntC de S. aureus no es una proteína lipidada.

45. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 26 a 44, en la que la proteína de portador es el toxoide C. diphtheriae CRM_{197}.

46. Una composición inmunogénica que comprende: un polipéptido de factor de aglutinación A (ClfA) de S. aureus aislado, un polipéptido de factor de aglutinación B (ClfB) de S. aureus aislado, y una proteína MntC de S. aureus aislada.

47. La composición inmunogénica de la reivindicación 46, en la que el polipéptido de ClfA es un fragmento de polipéptido que comprende el dominio de unión a fibrinógeno de ClfA.

48. La composición inmunogénica de la reivindicación 47, en la que el fragmento de polipéptido de ClfA es un dominio de unión a fibrinógeno que comprende los dominios de ClfA N1, N2 y N3.

49. La composición inmunogénica de la reivindicación 47, en la que el fragmento de polipéptido de ClfA es un dominio de unión a fibrinógeno que comprende los dominios de ClfA N2 y N3.

50. La composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 47, 48 y 49, en la que el dominio de unión a fibrinógeno de ClfA se une a fibrinógeno a un nivel reducido en comparación con la unión que se observa a fibrinógeno con el dominio de unión a fibrinógeno nativo de ClfA.

51. La composición inmunogénica de la reivindicación 50, en la que el dominio de unión a fibrinógeno muestra unión reducida a fibrinógeno a través de tener una sustitución de aminoácidos en uno o más de Tyr 338, Tyr 256, Pro 336, Lys 389, Ala 254 y Ile 387.

242

52. La composición inmunogénica de la reivindicación 51, en la que la sustitución de aminoácidos en uno o más de Tyr 338, Tyr 256, Pro 336, Lys 389, Ala 254 y Ile 387 es por Ala o Ser.

53. La composición inmunogénica de la reivindicación 52, en la que la Tyr 338 se sustituye por Ala.

54. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 46 a 53, en la que el polipéptido de ClfB de S. aureus es un fragmento de polipéptido que comprende el dominio de unión a fibrinógeno de ClfB.

55. La composición inmunogénica de la reivindicación 54, en la que el fragmento de polipéptido de ClfB de S. aureus es un dominio de unión a fibrinógeno que comprende los dominios de ClfB N1, N2 y N3.

56. La composición inmunogénica de la reivindicación 54, en la que el fragmento de polipéptido de ClfB de S. aureus es un dominio de unión a fibrinógeno que comprende los dominios de ClfB N2 y N3.

57. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 46 a 56, en la que la MntC de S. aureus es una proteína lipidada.

58. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 46 a 56, en la que la MntC de S. aureus no es una proteína lipidada.

59. Una composición inmunogénica que comprende: una proteína MntC de S. aureus aislada, un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 5 conjugado con una proteína de portador, y un polisacárido capsular de S. aureus aislado de tipo 8 conjugado con una proteína de portador.

60. La composición de la reivindicación 59, en la que la proteína MntC se produce de forma recombinante.

61. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 59 o 60, en la que el polisacárido capsular de tipo 5 es un polisacárido capsular de alto peso molecular de entre 20 y 1.000 kDa.

62. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 59 a 61, en la que el polisacárido capsular de alto peso molecular de tipo 5 tiene un peso molecular de entre 70 y 300 kDa.

63. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 59 a 62, en la que el polisacárido capsular de tipo 5 está entre un 10 % y un 100 % O-acetilado.

64. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 59 a 62, en la que el polisacárido capsular de tipo 5 está entre un 50 y un 100 % O-acetilado

65. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 59 a 62, en la que el polisacárido capsular de tipo 5 está entre un 75 % y un 100 % O-acetilado.

66. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 59 a 65, en la que el polisacárido capsular de tipo 8 tiene un peso molecular de entre 20 y 1.000 kDa.

67. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 59 a 65, en la que el polisacárido capsular de tipo 8 tiene un peso molecular de entre 70 y 300 kDa.

68. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 59 a 67, en la que el polisacárido capsular de tipo 8 está entre un 10 % y un 100 % O-acetilado.

69. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 59 a 67, en la que el polisacárido capsular de tipo 8 está entre un 50 % y un 100 % O-acetilado.

70. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 59 a 67, en la que el polisacárido capsular de tipo 8 está entre un 75 % y un 100 % O-acetilado.

71. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 70, que además comprende al menos una proteína a partir de la familia de proteínas de repetición de serina-aspartato (Sdr) que se selecciona del grupo que consiste en SdrC, SdrD y SdrE.

72. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 71, que además comprende la proteína de determinante de superficie de hierro B (IsdB).

73. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 72, que además comprende un adyuvante.

74. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 73, que además comprende un portador farmacéuticamente aceptable.

75. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 74, que además comprende uno cualquiera de los siguientes antígenos: Opp3a, DltD, HtsA, LtaS, IsdA, IsdC, SdrF, SdrG, SdrH, SrtA, SpA, Sbi FmtB, alfa-hemolisina (hla), beta-hemolisina, proteína A de unión a fibronectina (fnbA), proteína B de unión a fibronectina (fnbB), coagulasa, Fig, map, leucocidina Panton-Valentine (pvl), alfa-toxina y sus variantes, gamma-toxina (hlg) y variantes, ica, transportador ABC inmunodominante, transportador Mg2+, transportador ABC de Ni, RAP, autolisina, receptores de laminina, IsaA/PisA, IsaB/PisB, SPOIIIE, SsaA, EbpS, Sas A, SasF, SasH, EFB (FIB), SBI, Npase, EBP, sialoproteína II de unión a hueso,

precursor de aureolisina (AUR)/Sepp1, Cna, y fragmentos de los mismos tal como M55, TSST-1, mecA, poli-N-acetilglucosamina (PNAG/dPNAG) exopolisacárido, GehD, EbhA, EbhB, SSP-1, SSP-2, HBP, proteína de unión a vitronectina, HarA, EsxA, EsxB, Enterotoxina A, Enterotoxina B, Enterotoxina C1, y autolisina novedosa.

76. Un procedimiento de inducción de una respuesta inmunitaria frente a Staphylococcus aureus que comprende la administración a un sujeto de una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 75.

77. El procedimiento de la reivindicación 76, en el que la respuesta inmunitaria evita o reduce una enfermedad o afección asociada con un organismo estafilocócico en un sujeto; o evita o reduce uno o más síntomas asociados con un organismo estafilocócico en un sujeto.

78. El procedimiento de la reivindicación 77, en el que la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en enfermedad invasiva por S. aureus, septicemia y estado de portador.

79. El procedimiento de la reivindicación 76, en el que el sujeto se está sometiendo a un procedimiento quirúrgico.

80. El procedimiento de la reivindicación 79, en el que el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico opcional o un procedimiento quirúrgico no opcional.

81. El procedimiento de la reivindicación 79, en el que el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico cardio-torácico.

82. El procedimiento de la reivindicación 76, en el que la respuesta inmunitaria inducida comprende la generación de anticuerpos que tiene actividad opsonofagocítica (OPA) frente a S. aureus.

83. El procedimiento de la reivindicación 76, en el que la respuesta inmunitaria inducida comprende la generación de títulos significativamente más altos de anticuerpos opsonofagocíticos específicos para S. aureus en comparación con la que se observa en sujetos no inmunizados.

84. El procedimiento de la reivindicación 83, en el que el título opsonofagocítico es al menos 1:20.

85. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 76 a 84, en el que el S. aureus es MSSA.

86. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 76 a 84, en el que el S. aureus es VRSA.

245

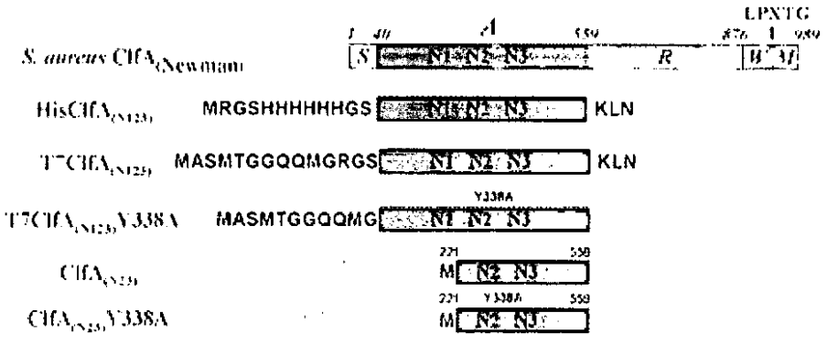
87. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 76 a 84, en el que el S. aureus es VISA.

88. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 76 a 84, en el que el S. aureus es MRSA.

89. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 76 a 88, en el que el sujeto es un ser humano, una mascota doméstica, o un animal de ganado.

90. Un procedimiento para conferir inmunidad pasiva a un sujeto que comprende las etapas de (1) generar una preparación de anticuerpos usando unas composiciones inmunogénicas de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 75; y (2) administrar la preparación de anticuerpos al sujeto para conferir inmunidad pasiva.

FIGURA 1


LPXTG
S. aureus ClfA(Newman)
S
N1 N2 N3
R
W M
HisClfA(N123)
MRGSHHHHHHGS
KLN
T7ClfA(N123)
MASMTGGQQMGRGS
KLN
T7ClfA(N123)Y338A
MASMTGGQQMG
Y338A
ClfA(N23)
M
N2 N3
ClfA(N23)Y338A

246

FIGURA 2

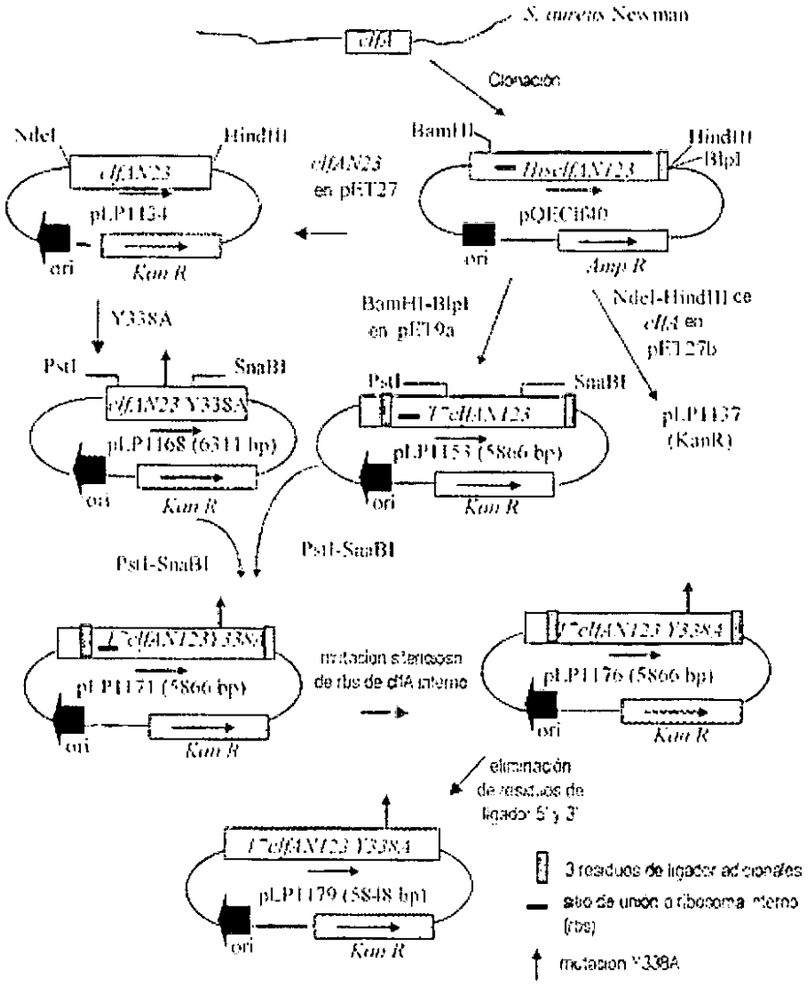
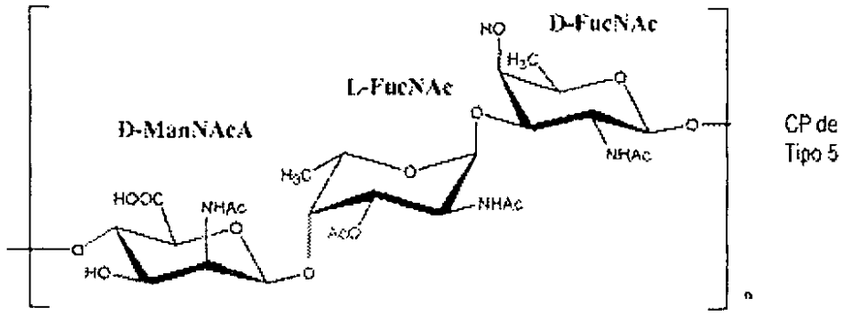
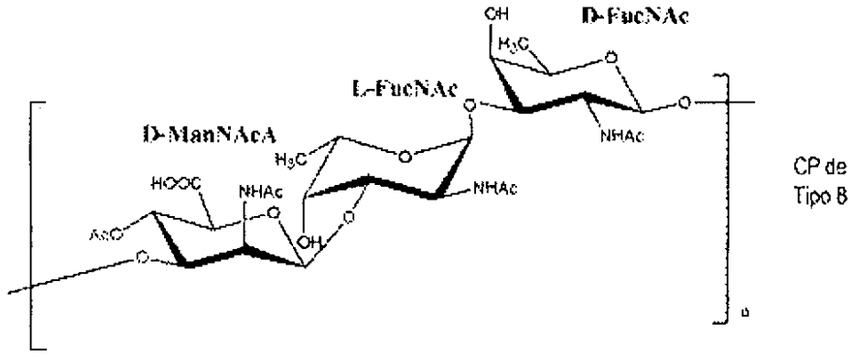

S. aureus Newman
clfA
Clonación
NdeI
HindIII
clfAN23
pLP1134
ori
Kan R
clfAN23 en pET27
BamHI
HindIII
BlpI
BsclfAN123
pQECH40
ori
Amp R
Y338A
BamHI-BlpI en pET9a
NdeI-HindIII de clfA en pET27b
pLP1137 (KanR)
PstI
SnaBI
clfAN23 Y338A
pLP1168 (6311 bp)
ori
Kan R
TclfAN123
pLP1153 (5866 bp)
ori
Kan R
PstI-SnaBI
PstI-SnaBI
TclfAN123 Y338A
pLP1171 (5866 bp)
ori
Kan R
mutacion silenciosa de rbs de clfA interno
TclfAN123 Y338A
pLP1176 (5866 bp)
ori
Kan R
eliminación de restos de ligador 5' y 3'
TclfAN123 Y338A
pLP1179 (5848 bp)
ori
Kan R
3 residuos de ligador adicionales
sitio de union a ribosoma interno (rbs)
mutacion Y338A

FIGURA 4



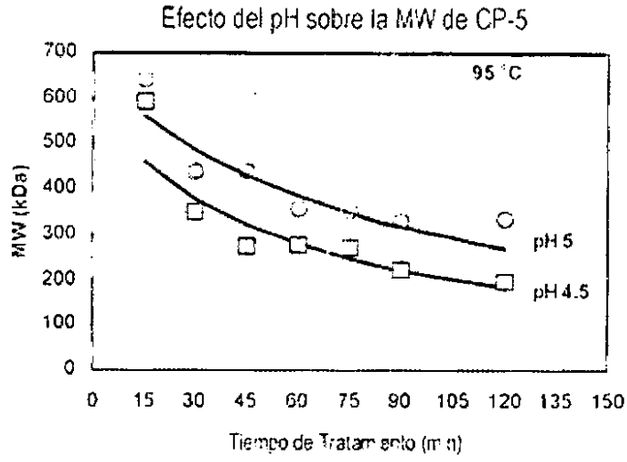
[-4)-β-D-ManNAcA-(1-4)-α-L-FucNAc(3-O-Ac)-(1-3)-β-D-FucNAc-(1-]$_n$



[-3)-β-D-ManNAcA(4-O-Ac)-(1-3)-α-L-FucNAc-(1-3)-α-D-FucNAc-(1-]$_n$

FIGURA 5

A.


Efecto del pH sobre la MW de CP-5
95 °C
MW (kDa)
700
600
500
400
300
200
100
0
pH 5
pH 4.5
0 15 30 45 60 75 90 105 120 135 150
Tiempo de Tratamiento (min)

B.

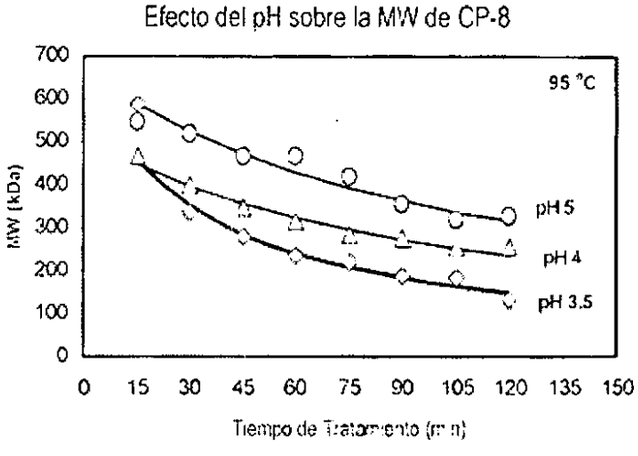
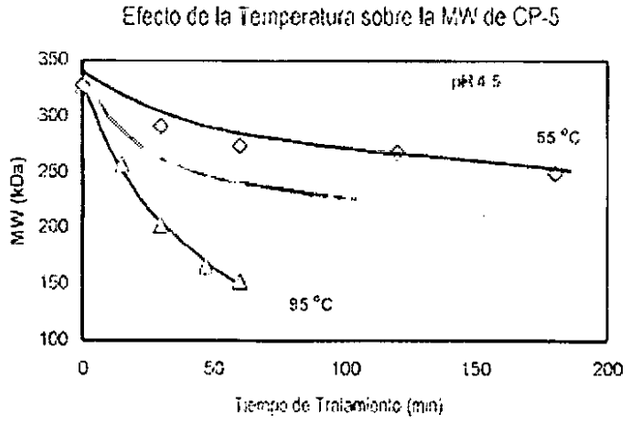

Efecto del pH sobre la MW de CP-8
95 °C
MW (kDa)
700
600
500
400
300
200
100
0
pH 5
pH 4
pH 3.5
0 15 30 45 60 75 90 105 120 135 150
Tiempo de Tratamiento (min)

FIGURA 6

A.


Efecto de la Temperatura sobre la MW de CP-5
pH 4.5
55 °C
95 °C
MW (kDa)
350
300
250
200
150
100
0
50
100
150
200
Tiempo de Tratamiento (min)

B.

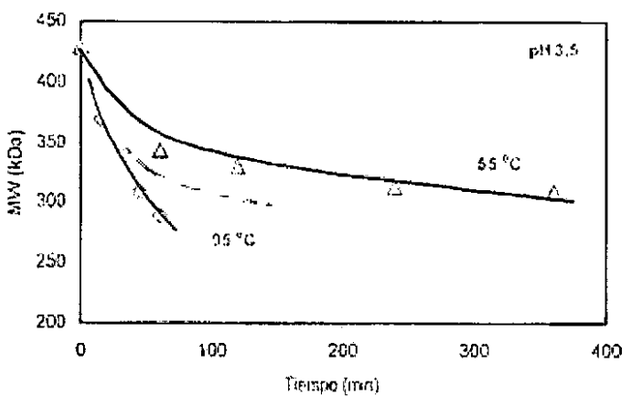

Efecto de la Temperatura sobre la MW de CP-8
pH 3.5
55 °C
95 °C
MW (kDa)
450
400
350
300
250
200
0
100
200
300
400
Tiempo (min)

FIGURA 7

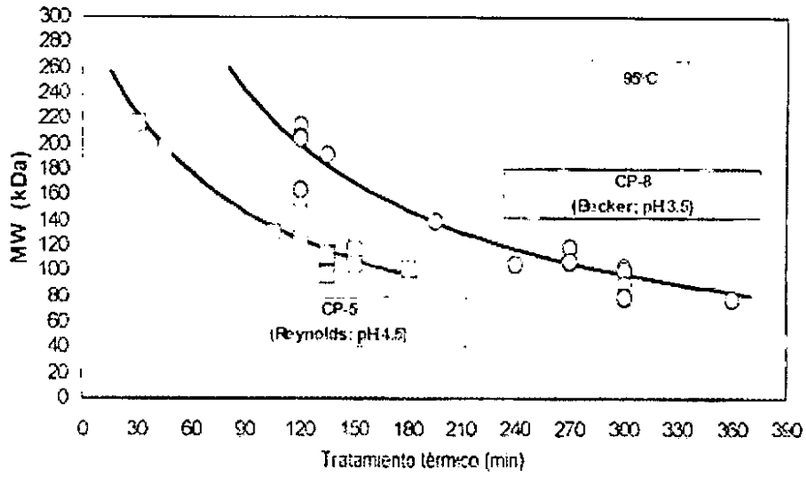

MW (kDa)
300
280
260
240
220
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
30
60
90
120
150
180
210
240
270
300
330
360
390
Tratamiento térmico (min)
95°C
CP-8
(Becker; pH3.5)
CP-5
(Reynolds; pH4.5)

FIGURA 8A Alineación de CfA 1/5

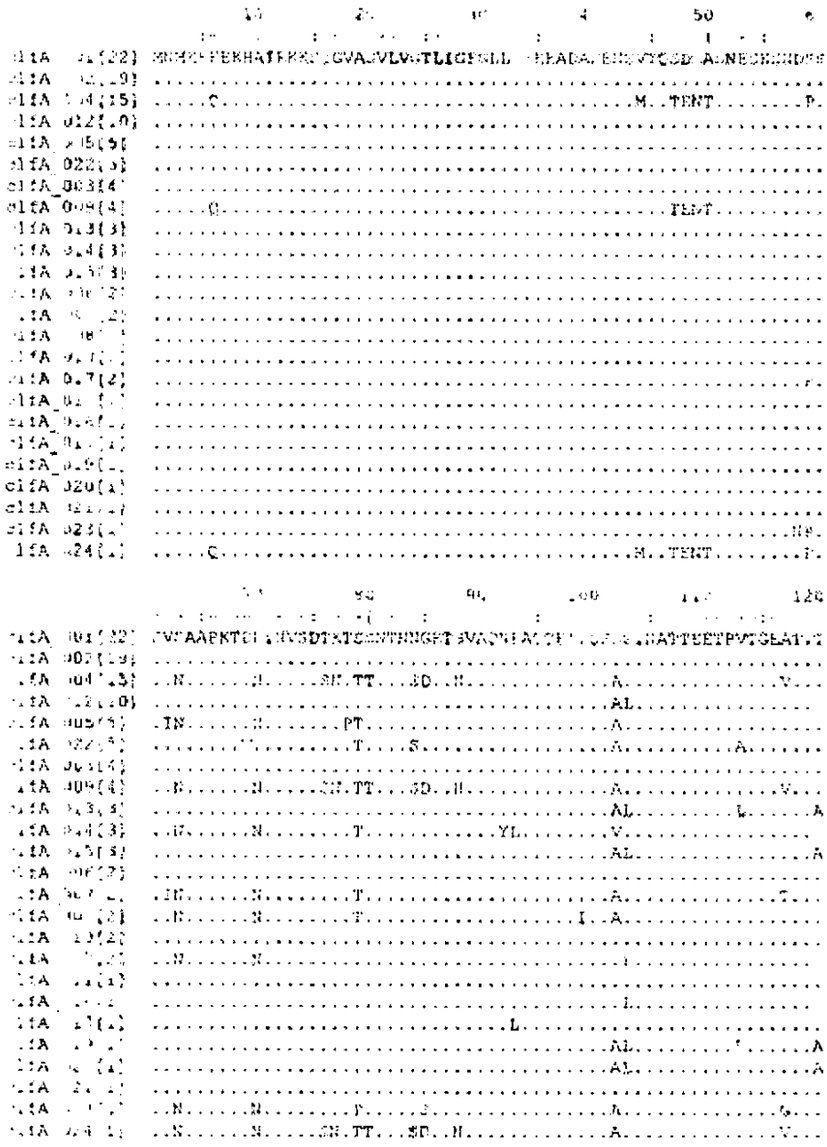


FIGURA 8B Alineación de CHA 2/5

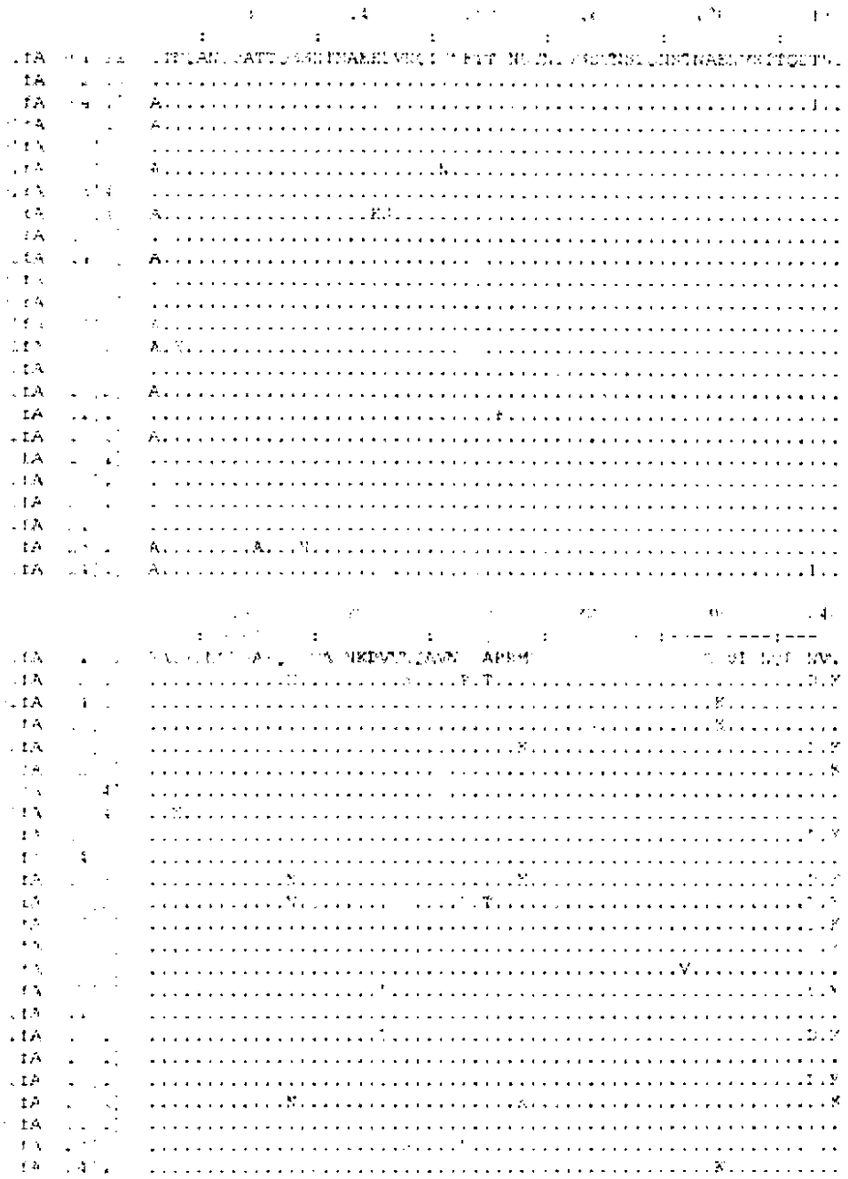


FIGURA 8C Alineación de CIfA 3/5

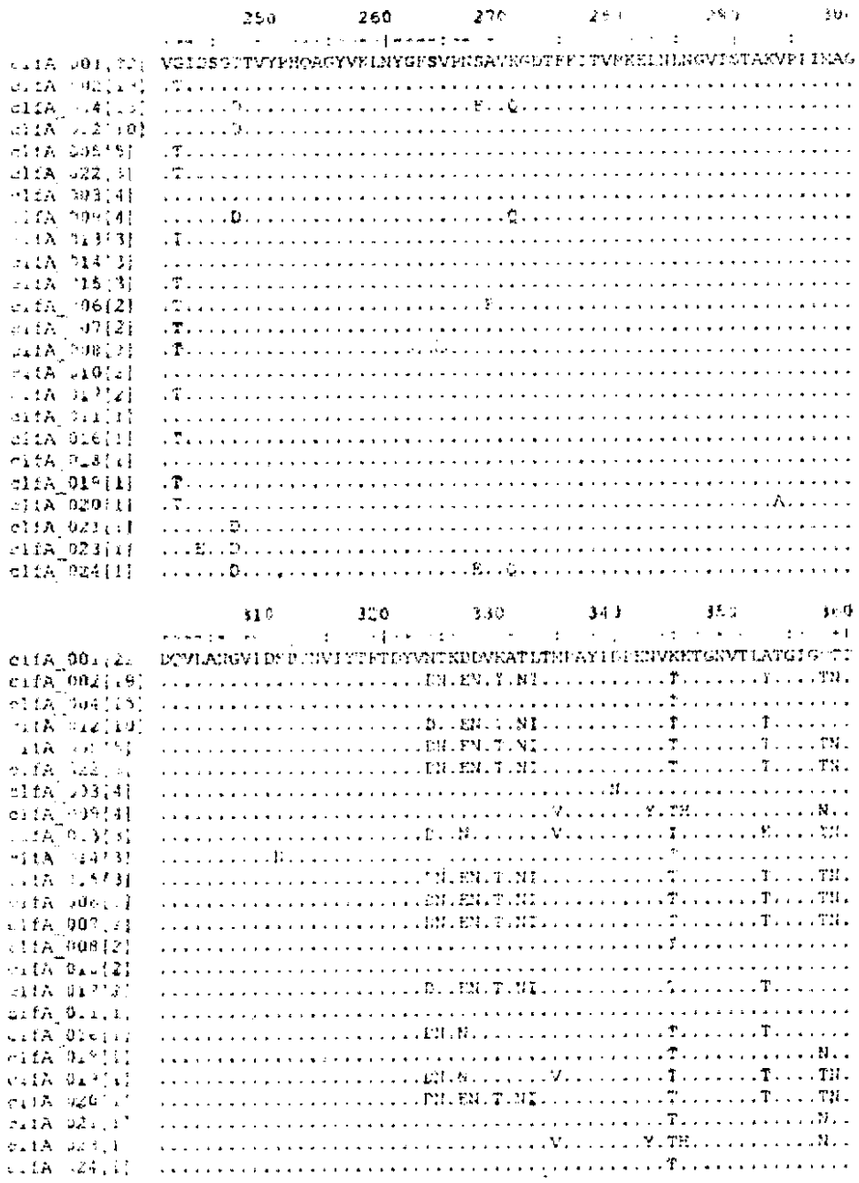


FIGURA 8D Alineación de CfA 4/5

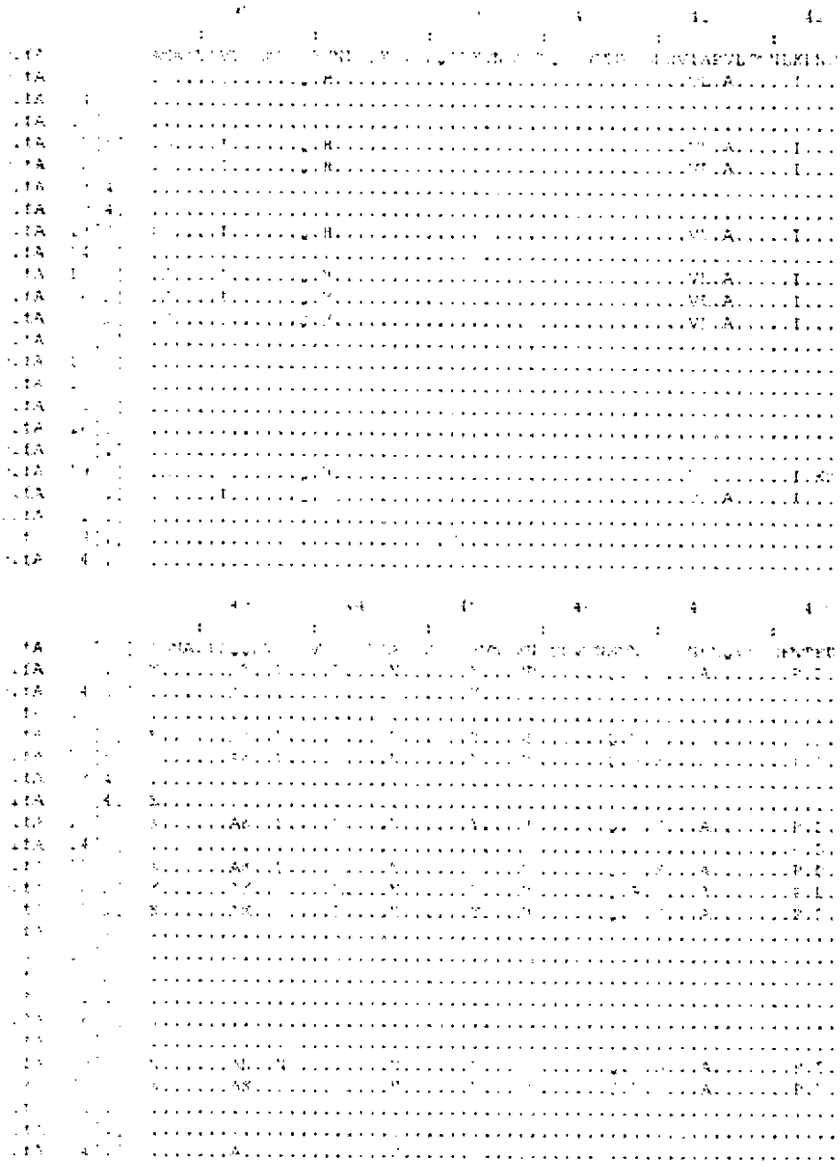


FIGURA 8E. Alineación de CHA 5/5

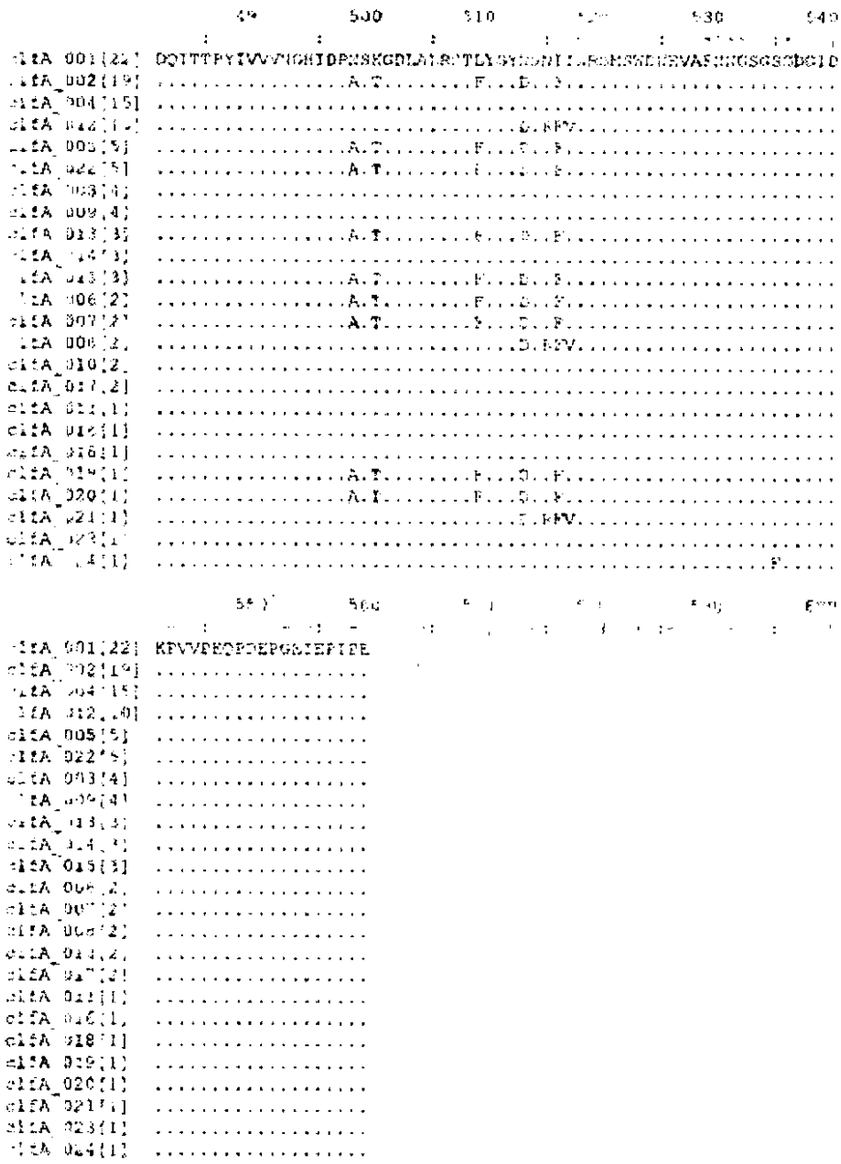


FIGURA 9
Árbol filogenético de ClfA

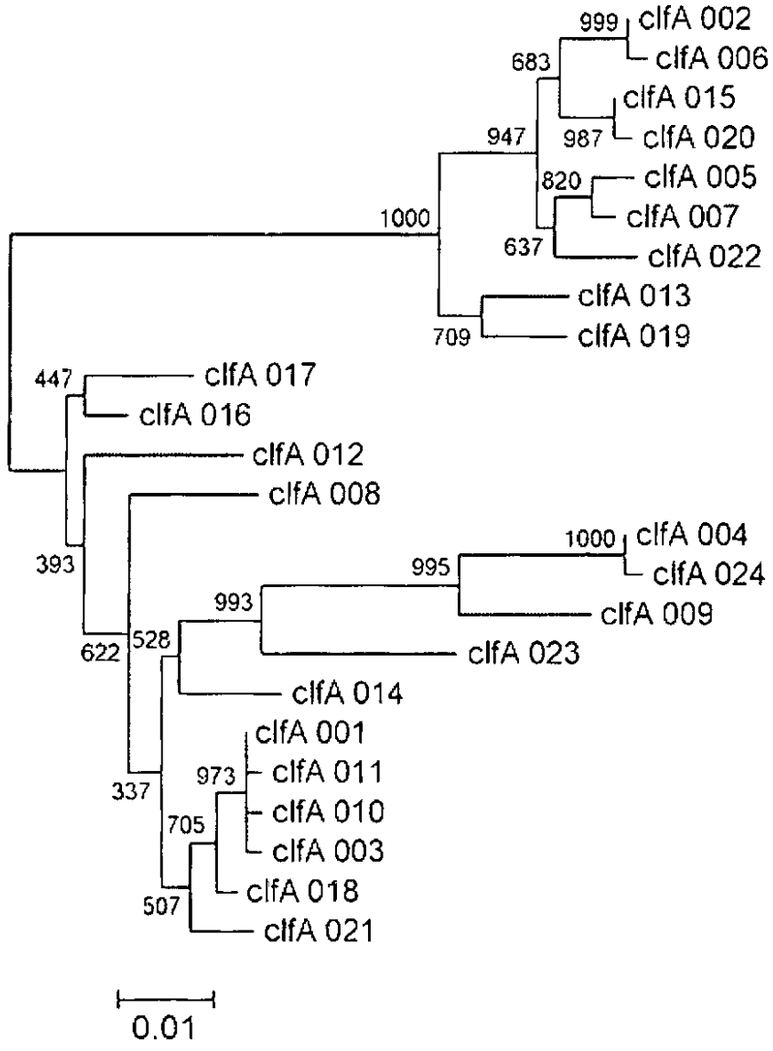


FIGURA 10A Alineación de CIfB 1/5

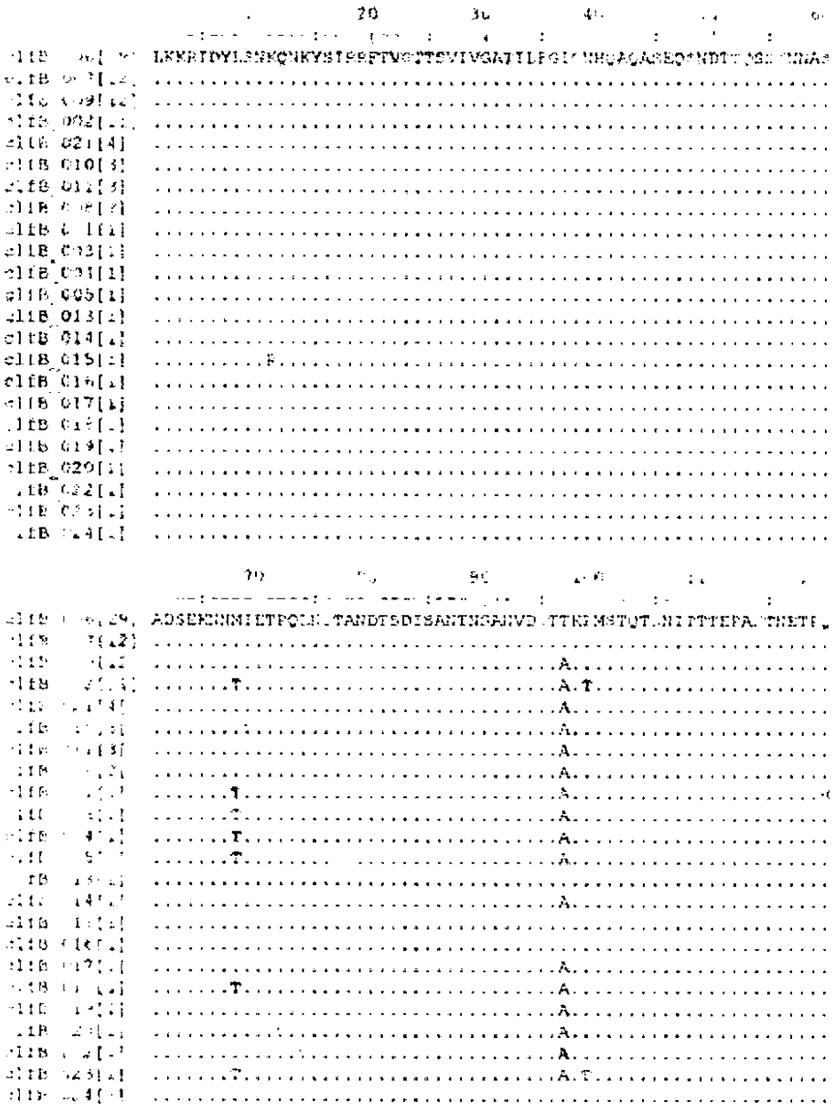


FIGURA 10B Alineación de CBB 2/5

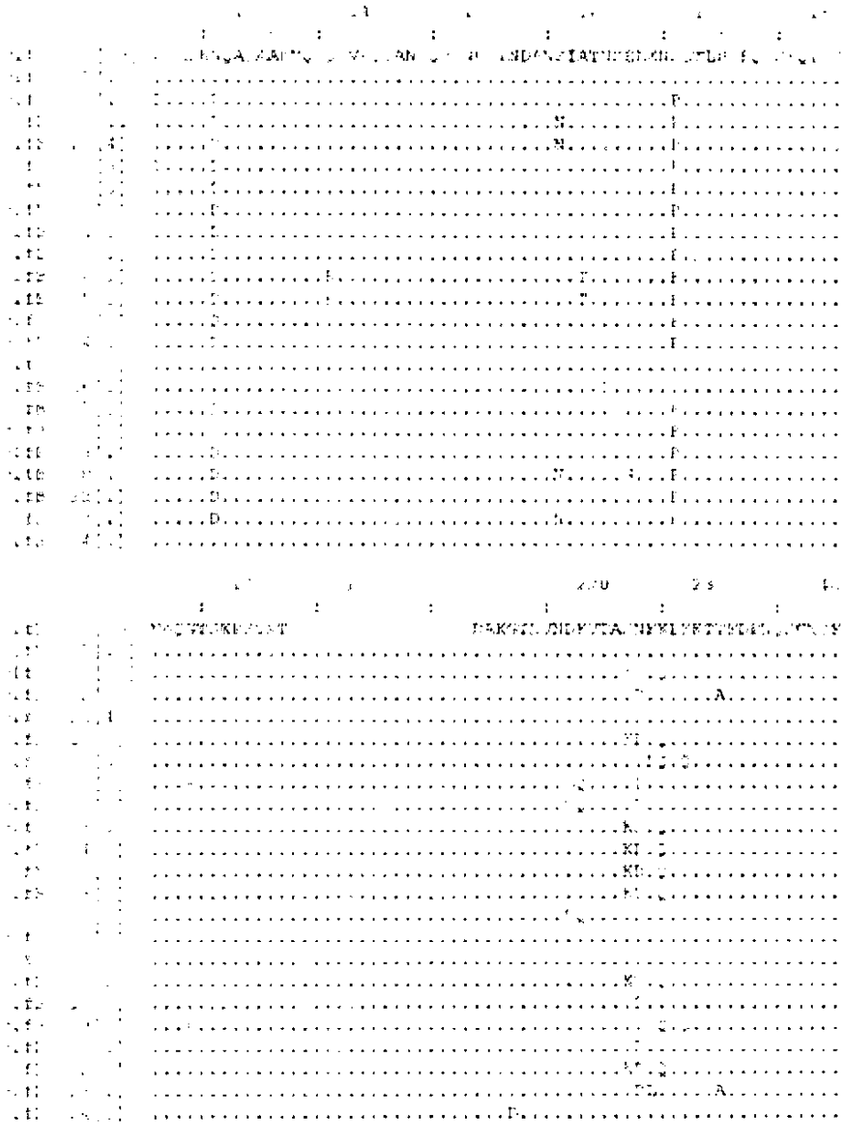


FIGURA 10CAlineación de ClfB 3/5

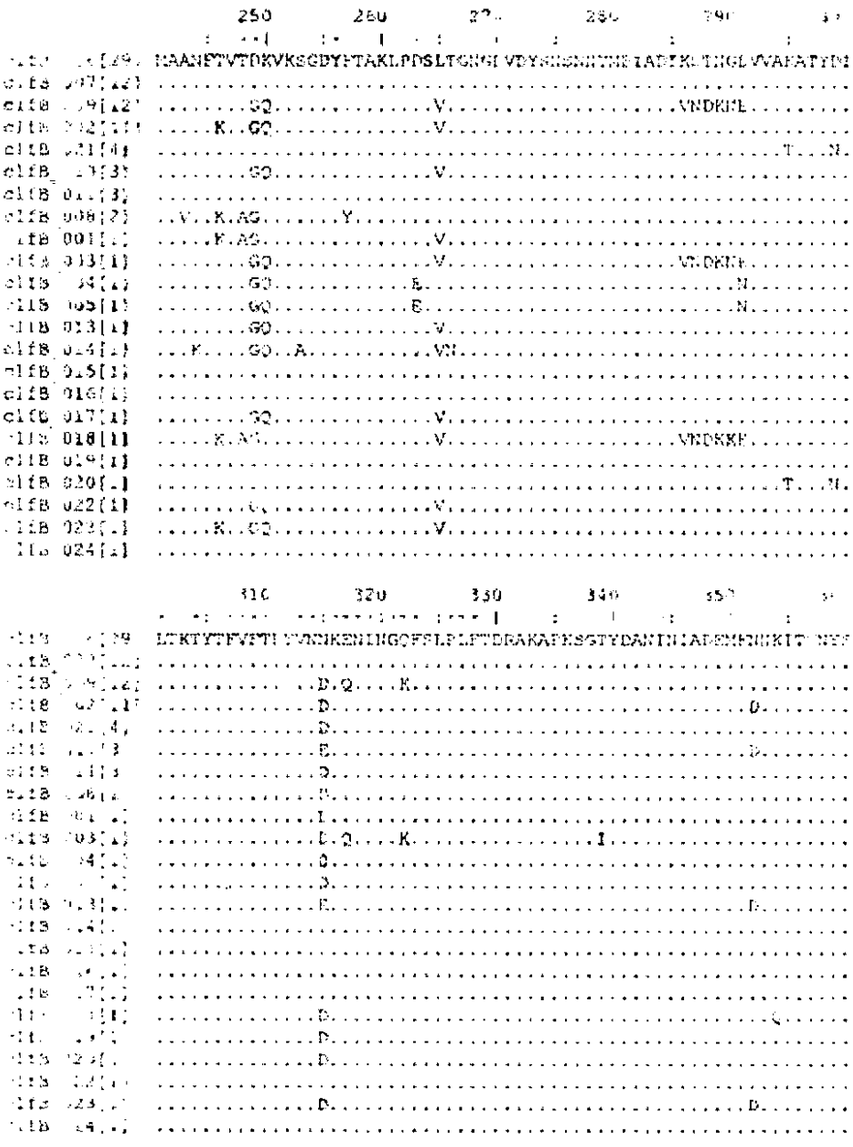
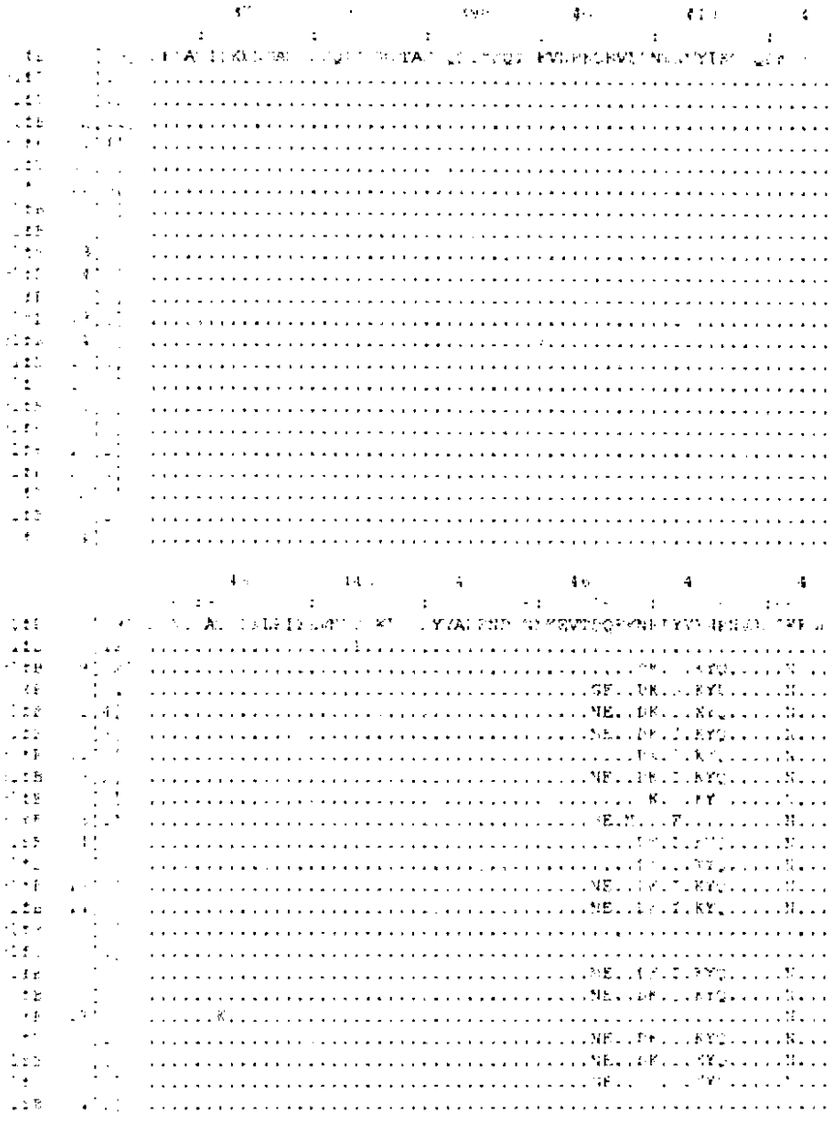


FIGURA 10D Alineación de CHB 4/5



254

FIGURA 10E Alineación de CHB 5/5

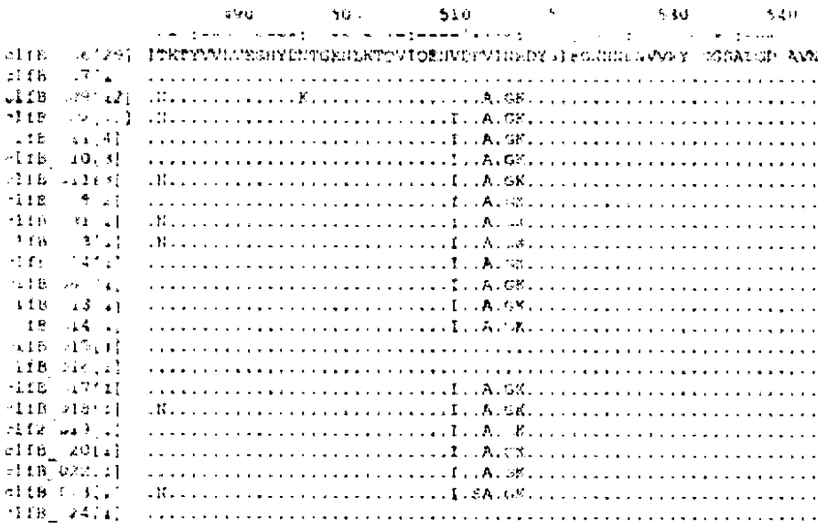


FIGURA 11

Árbol filogenético de ClfB

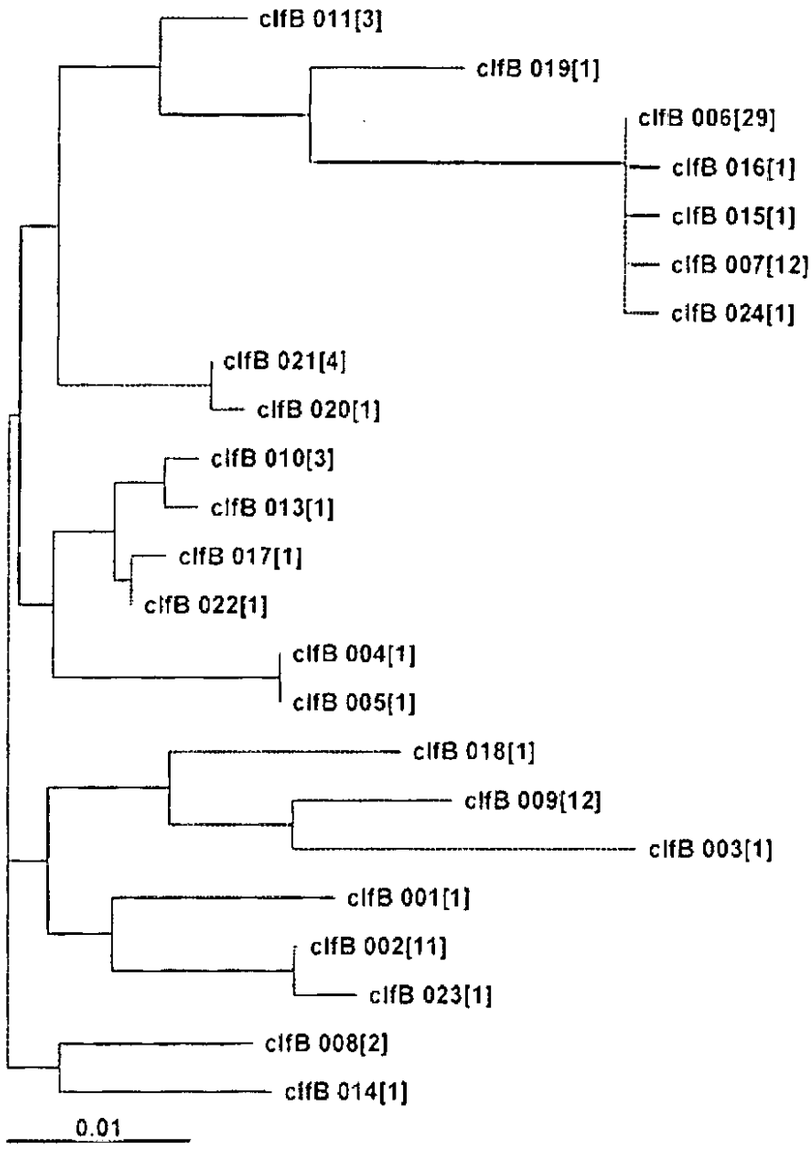


FIGURA 12 MntC Alineación

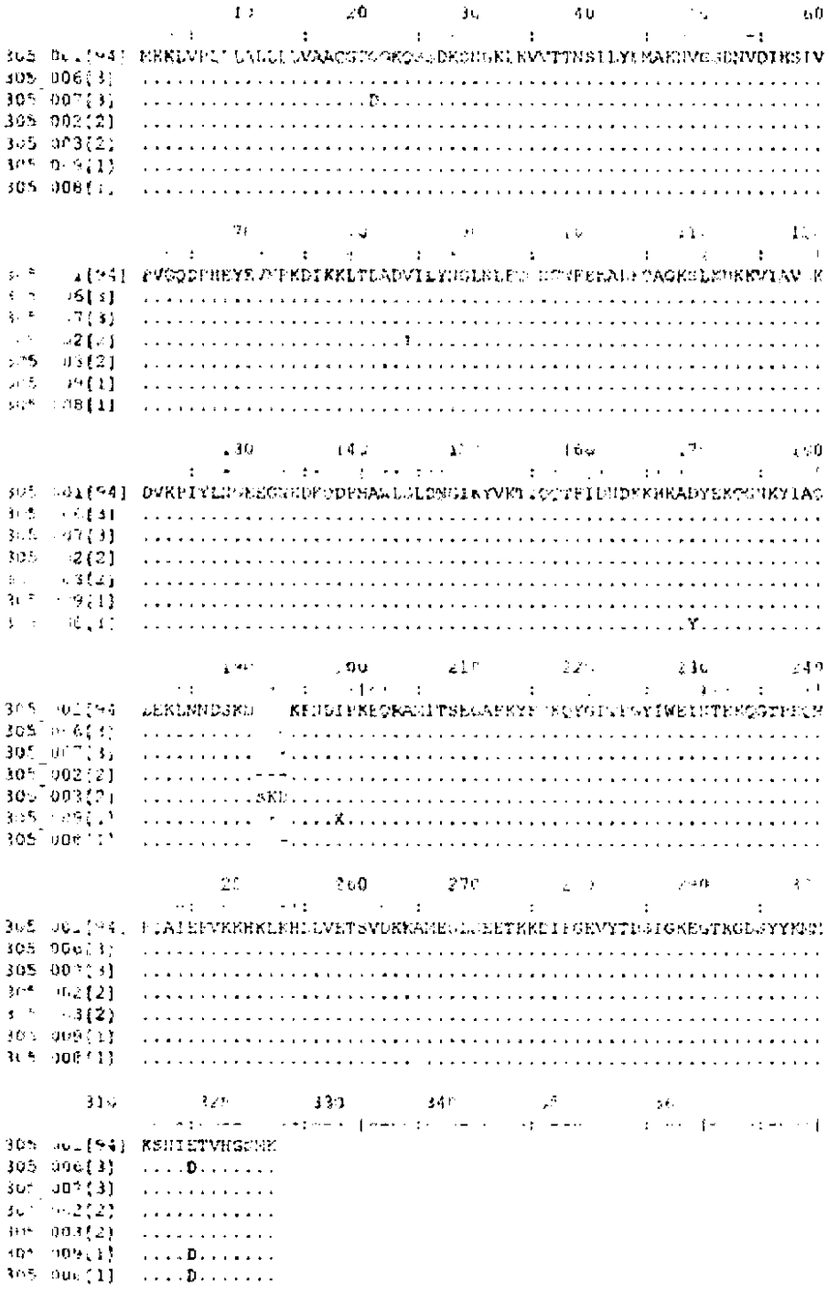


FIGURA 13

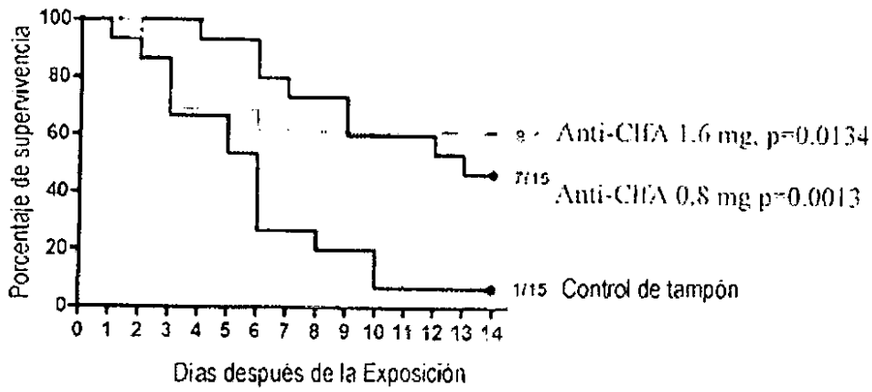

Porcentaje de supervivencia
100
80
60
40
20
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
Dias después de la Exposición
Anti-CIfA 1.6 mg, p=0.0134
7/15
Anti-CIfA 0,8 mg p=0.0013
1/15 Control de tampón

FIGURA 14

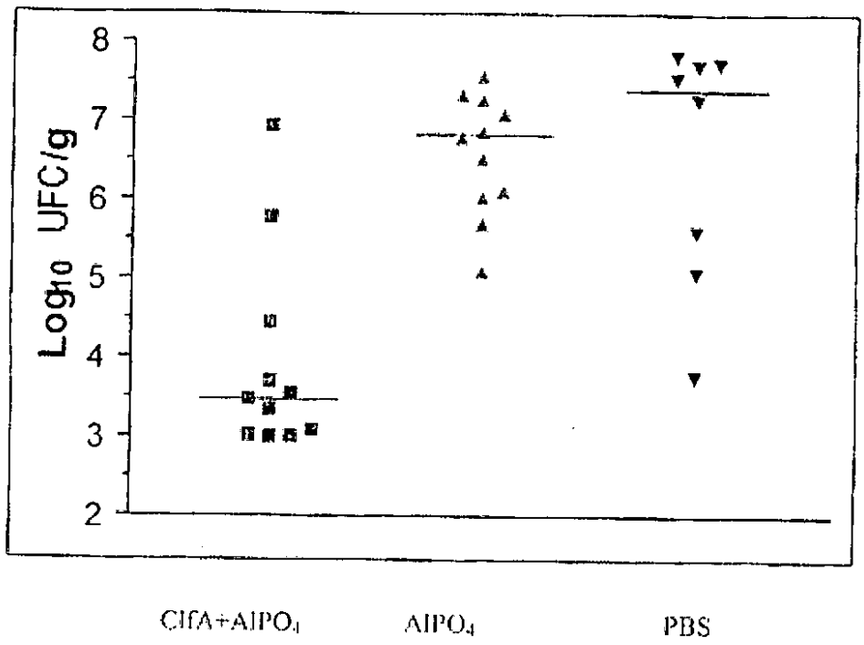
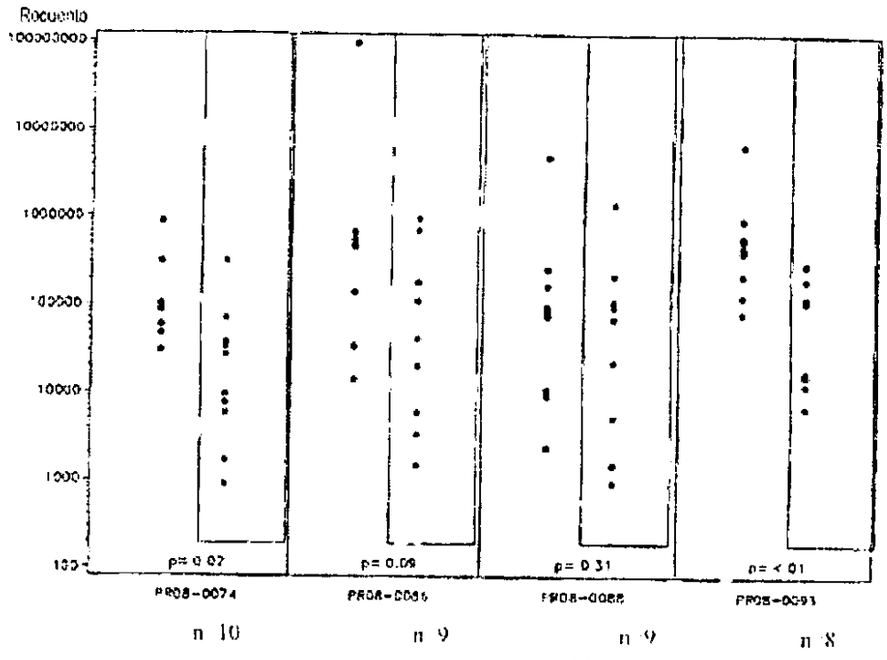


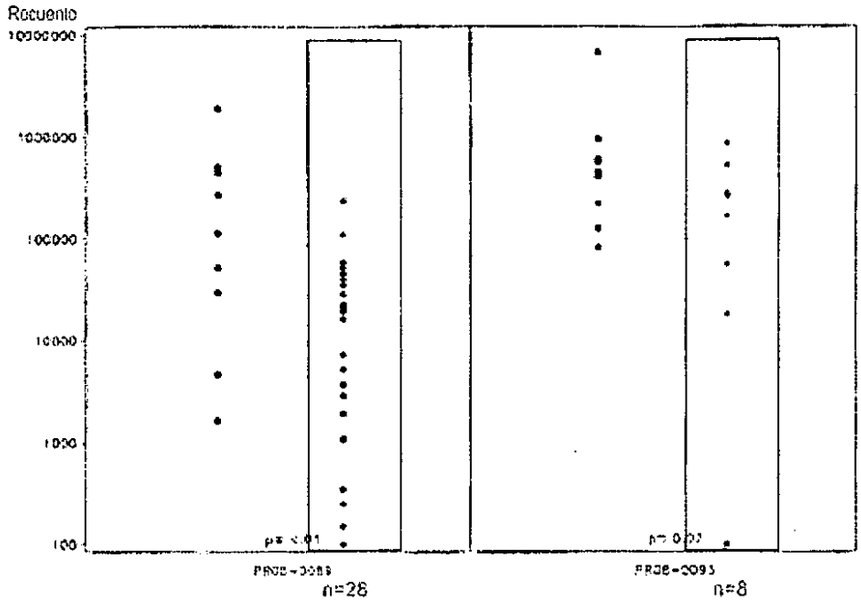
FIGURA 15A



Metanálisis p = 0.0001

El área sombreada es el grupo inmunizado con MntC

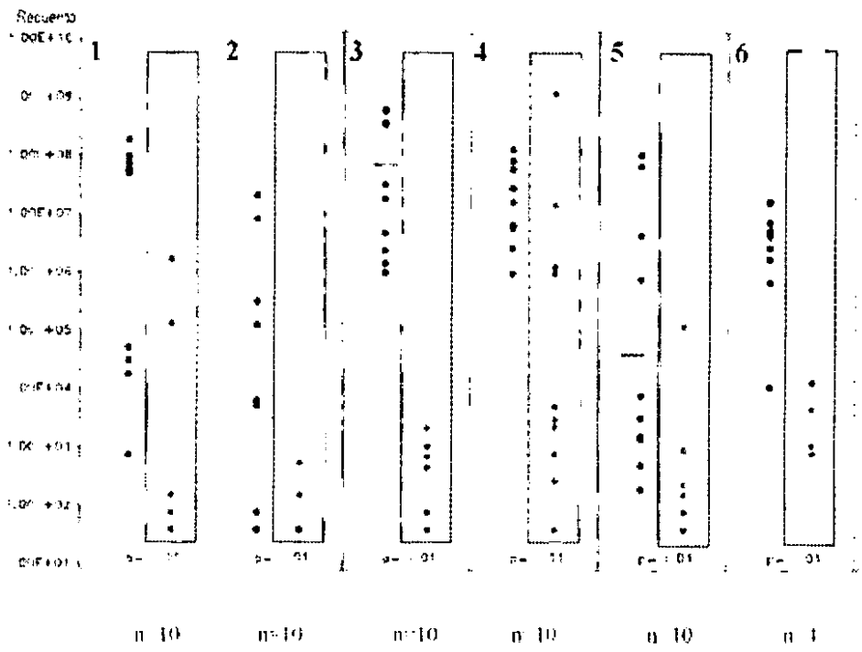
FIGURA 15B



Metanálisis p <= 0.0001

El área sombreada es el grupo inmunizado con MntC

FIGURA 16



Metanálisis p =< 0.0001

El área sombreada es el grupo inmunizado con conjugado de polisacárido de serotipo 5

FIGURA 17

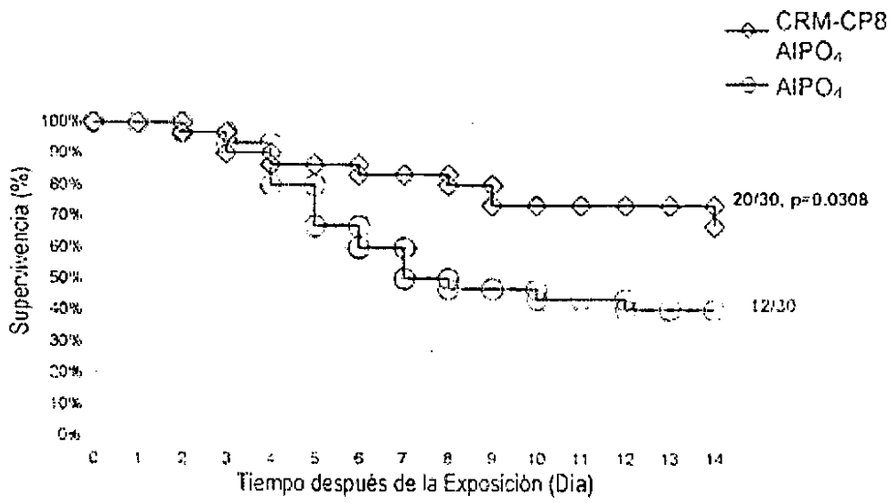

CRM-CP8
AlPO4
AlPO4
Supervivencia (%)
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
Tiempo después de la Exposición (Día)
20/30, p=0.0308
12/30

FIGURA 18

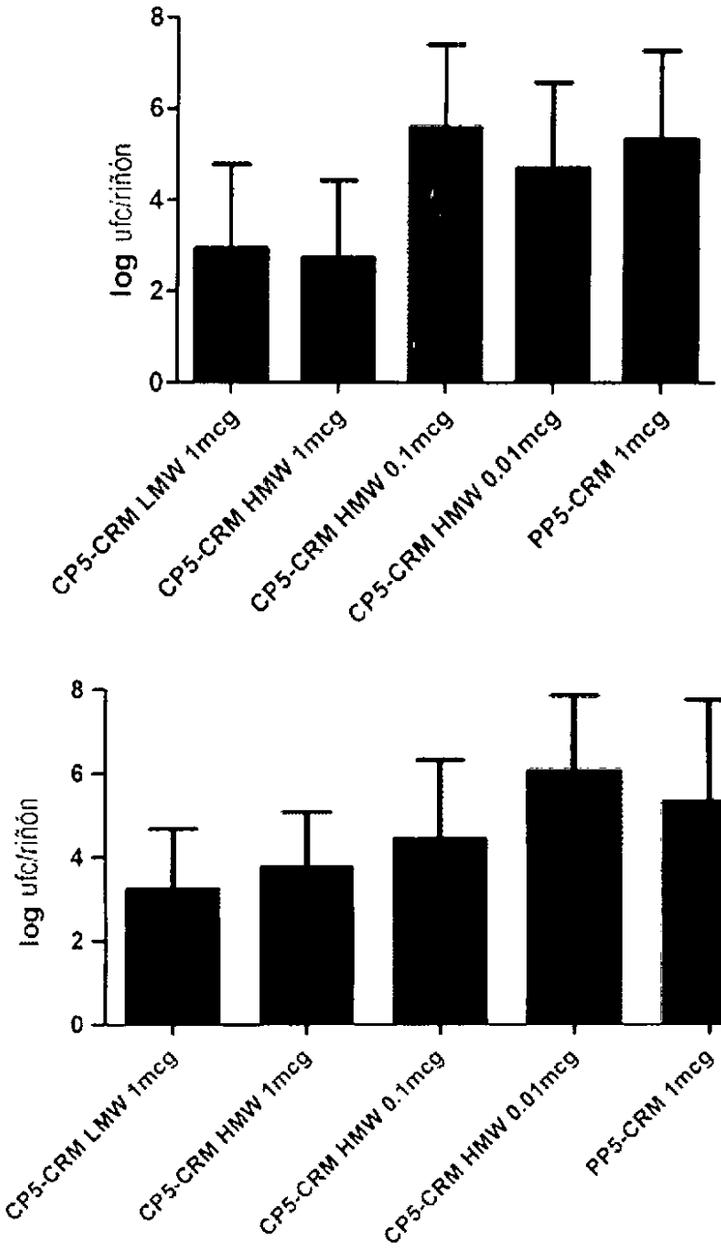

log ufc/riñón
8
6
4
2
0
CP5-CRM LMW 1mcg
CP5-CRM HMW 1mcg
CP5-CRM HMW 0.1mcg
CP5-CRM HMW 0.01mcg
PP5-CRM 1mcg
log ufc/riñón
8
6
4
2
0
CP5-CRM LMW 1mcg
CP5-CRM HMW 1mcg
CP5-CRM HMW 0.1mcg
CP5-CRM HMW 0.01mcg
PP5-CRM 1mcg

FIGURA 19

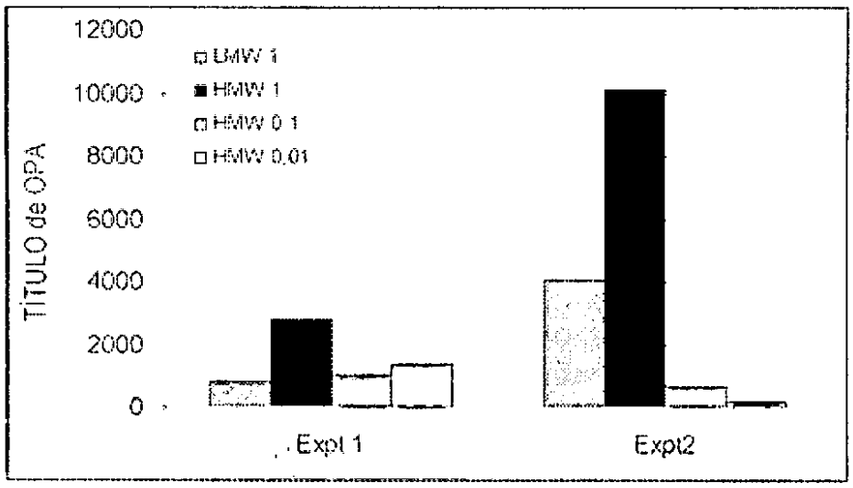
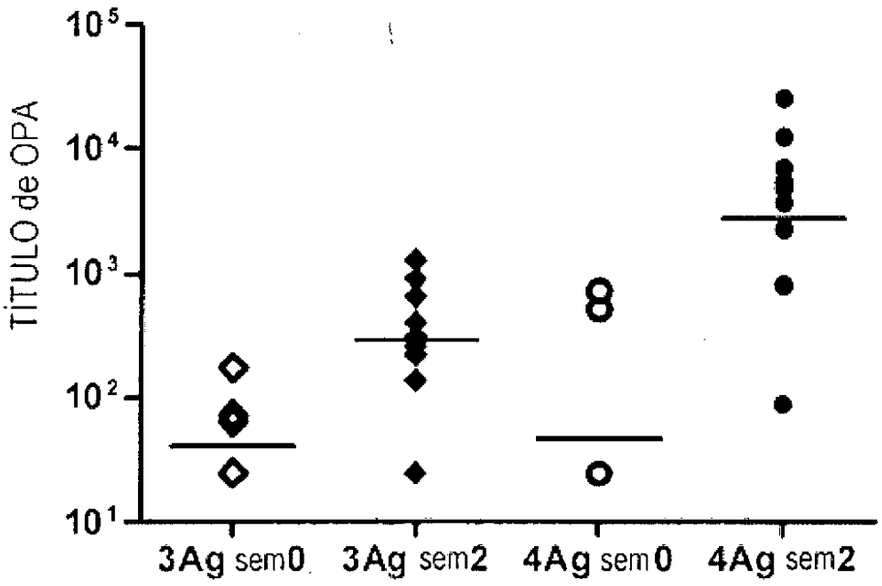

12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
TÍTULO de OPA
LMW 1
HMW 1
HMW 0 1
HMW 0,01
Expt 1
Expt2

FIGURA 20


TÍTULO de OPA
10⁵
10⁴
10³
10²
10¹
3Ag sem0
3Ag sem2
4Ag sem0
4Ag sem2

RESUMEN

La presente invención se refiere a composiciones inmunogénicas, que comprenden polipéptidos y polisacáridos a partir de Staphylococcus aureus. La presente invención también se refiere a composiciones inmunogénicas, que comprenden polisacáridos de cápsula de Staphylococcus aureus conjugados con una proteína de portador. Además, la invención se refiere a unos procedimientos de inducción de una respuesta inmunitaria en sujetos frente a Staphylococcus aureus usando composiciones inmunogénicas de los polisacáridos de cápsula y polipéptidos de Staphylococcus aureus.

Asn Pro Ser Gly Asp Asn Val Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu
405 410 415

Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser
420 425 430

Ile Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser Tyr
435 440 445

Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile
450 455 460

Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro 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 Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr
500 505 510

Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala
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
545 550 555

<210> 83
<211> 1674
<212> DNA
<213> Staphylococcus aureus

<400> 83
atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60

gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120

gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180

agcgttagtg ctgcacctaa aacagacgac acaaacgtga gtgatactaa aacatcgtca 240

aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300

tcagcattaa caaatgcaac tacggaagaa actccggtaa ctggtgaagc tactacggca 360

acgaatcaag ctaatacacc ggcaacaact caatcaagca atacaaatgc ggaggaatta 420

gtgaatcaaa caagtaatga aacgacttct aatgatacta atacagtatc atctgtaaat 480

tcacctcaaa attctacaaa tgcggaaaat gtttcaacaa cgcaagatac ttcaactgaa 540

gcaacacctt caaacaatga atcagctcca cagagtacag atgcaagtaa taaagatgta 600

gttaatcaag cggttaatac aagtgcgcct agaatgagag catttagttt atcggcagta 660

gctgcagatg caccggcagc tggcaaagat attacgaatc agttgacgaa tgtgacagtt 720

ggtattgact ctggagatac agtttatccg caccaagcag gctatgtcaa actgaattat 780

ggtttttcag tgcctaattc tgctgttaaa ggtgacacat tcaaaataac tgtacctaaa 840

gaattaaact taaatggtgt aacttcaact gctaaagtgc ctccaattat ggccggagat 900

caagtattgg caaatggtgt aatcgatagt gatggtaatg ttatttatac atttacagac 960

tatgttgata ctaaagaaaa tgtaacagct aatattacta tgccagctta tattgaccct 1020

gaaaatgtta caaagacagg taatgtaaca ttgacaactg gcataggtag tacaacagca 1080

aacaaaacag tattagtaga ttatgaaaaa tatggtaagt tttataactt atctattaaa 1140

ggtacaattg accaaatcga taaaacaaat aatacgtatc gtcagacaat ttatgtcaat 1200

ccaagtggag ataatgttat tgcgccggtt ttaacaggta atttaaaacc aaatacggat 1260

agtaatgcat taatagatca gcaaaataca agtattaaag tatataaagt agataatgca 1320

gctgatttat ctgaaagtta ctttgtgaat ccagaaaact ttgaggatgt cactaatagt 1380

gtgaatatta cattcccaaa tccaaatcaa tataaagtag agtttaatac gcctgatgat 1440

caaattacaa caccgtatat tgtagttgtt aatggtcata ttgatccgaa tagcaaaggt 1500

gatttagctt tacgttcaac tttatatgga tatgactcaa ggtttgtatg gagatctatg 1560

tcatgggaca acgaagtagc atttaataac ggatcaggtt ctggtgacgg tatcgataaa 1620

ccagttgttc ctgaacaacc tgatgagcct ggtgaaattg aaccaattcc agag 1674

<210> 84
<211> 558
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 84

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

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 Ala Leu Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro
100 105 110

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

Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln Thr
130 135 140

Ser Asn Glu Thr Thr Ser Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val Asn
145 150 155 160

Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln Asp
165 170 175

Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln Ser
180 185 190

Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr Ser
195 200 205

Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ser Ala Val Ala Ala Asp Ala
210 215 220

Pro Ala Ala Gly Lys Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asn Val Thr Val
225 230 235 240

Gly Ile Asp Ser Gly Asp Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr Val
245 250 255

Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly Asp
260 265 270

Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val Thr
275 280 285

Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu Ala
290 295 300

Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr Asp
305 310 315 320

Tyr Val Asp Thr Lys Glu Asn Val Thr Ala Asn Ile Thr Met Pro Ala
325 330 335

Tyr Ile Asp Pro Glu Asn Val Thr Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu Thr
340 345 350

Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp Tyr
355 360 365

Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile Asp
370 375 380

Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val Asn
385 390 395 400

Pro Ser Gly Asp Asn Val Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu Lys
405 410 415

Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser Ile
420 425 430

Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser Tyr Phe
435 440 445

Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile Thr
450 455 460

Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro Asp Asp
465 470 475 480

Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp Pro
485 490 495

Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr Asp
500 505 510

Ser Arg Phe Val Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala Phe
515 520 525

Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val Pro
530 535 540

Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
545 550 555

<210> 85

<211> 1674
<212> DNA
<213> Staphylococcus aureus

<400> 85
atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60

gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120

gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180

agcgttagtg ctgcacctaa aacagacgac acaaacgtga gtgatactaa aacatcgtca 240

aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300

tcagcattaa caaatgcaac tacggaagaa actccgttaa ctggtgaagc tactacggca 360

acgaatcaag ctaatacacc ggcaacaact caatcaagca atacaaatgc ggaggaatta 420

gtgaatcaaa caagtaatga aacgacttct aatgatacta atacagtatc atctgtaaat 480

tcacctcaaa attctacaaa tgcggaaaat gtttcaacaa cgcaagatac ttcaactgaa 540

gcaacacctt caaacaatga atcagctcca cagagtacag atgcaagtaa taaagatgta 600

gttaatcaag cggttaatac aagtgcgcct agaatgagag catttagttt agcggcagta 660

gctgcagatg caccggcagc tggcacagat attacgaatc agttgacaga tgtgaaagtt 720

actattgact ctggtacgac tgtgtatccg caccaagcag gttatgtcaa actgaattat 780

ggtttttcag tgcctaattc tgctgttaaa ggtgacacat tcaaaataac tgtacctaaa 840

gaattaaact taaatggtgt aacttcaact gctaaagtgc ctccaattat ggccggagat 900

caagtattgg caaatggtgt aatcgatagt gatggtaatg ttatttatac atttacagac 960

tatgttgata ctaaaaatga tgttaaagca acactaactg tgcctgcata cattgatcca 1020

gaaaatgtta caaagacggg taatgtaaca ttgaaaactg gcataggaac caatactgat 1080

agtaagacag ttttaatcga ctatgagaaa tatggacaat tccataattt atcaattaaa 1140

ggtacgattg atcaaatcga taaaacaaat aatacgtatc gtcaaacaat ttatgtcaat 1200

ccaagcggag ataacgttgt gttacctgcc ttaacaggta atttaattcc taatacaaag 1260

agtaatgcgt taatagatgc aaaaaacact gatattaaag tttatagagt agataatgct 1320

aatgatttat ctgaaagtta ttatgtgaat cctagcgatt ttgaagatgt aactaatcaa 1380

gttagaattt catttccaaa tgctaatcaa tacaaagtag aatttcctac ggacgatgat 1440

caaattacaa caccgtatat tgtagttgtt aatggccata ttgatcctgc tagcacaggt 1500

gatttagcac tacgttcgac attttatggt tatgattcta attttatatg gagatctatg 1560

tcatgggaca acgaagtagc atttaataac ggatcaggtt caggtgacgg tatcgataaa 1620

cctgttgttc ctgaacaacc tgatgagcct ggtgaaattg aaccaattcc agag 1674

<210> 86

<211> 558
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 86

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

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 Ala Leu Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro
            100                 105                 110

Leu Thr Gly Glu Ala Thr Thr Ala Thr Asn Gln Ala Asn Thr Pro Ala
        115                 120                 125

Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln Thr
    130                 135                 140

Ser Asn Glu Thr Thr Ser Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val Asn
145                 150                 155                 160

Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln Asp
                165                 170                 175

Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln Ser
            180                 185                 190

Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr Ser
        195                 200                 205

Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp Ala
    210                 215                 220

Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asp Val Lys Val
225                 230                 235                 240
```

Thr Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr Val
245 250 255

Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly Asp
260 265 270

Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val Thr
275 280 285

Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu Ala
290 295 300

Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr Asp
305 310 315 320

Tyr Val Asp Thr Lys Asn Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Val Pro Ala
325 330 335

Tyr Ile Asp Pro Glu Asn Val Thr Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu Lys
340 345 350

Thr Gly Ile Gly Thr Asn Thr Asp Ser Lys Thr Val Leu Ile Asp Tyr
355 360 365

Glu Lys Tyr Gly Gln Phe His Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile Asp
370 375 380

Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val Asn
385 390 395 400

Pro Ser Gly Asp Asn Val Val Leu Pro Ala Leu Thr Gly Asn Leu Ile
405 410 415

Pro Asn Thr Lys Ser Asn Ala Leu Ile Asp Ala Lys Asn Thr Asp Ile
420 425 430

Lys Val Tyr Arg Val Asp Asn Ala Asn Asp Leu Ser Glu Ser Tyr Tyr
435 440 445

Val Asn Pro Ser Asp Phe Glu Asp Val Thr Asn Gln Val Arg Ile Ser
450 455 460

Phe Pro Asn Ala Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Pro Thr Asp Asp Asp
465 470 475 480

Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp Pro

485 490 495

Ala Ser Thr Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Phe Tyr Gly Tyr Asp
500 505 510

Ser Asn Phe Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala Phe
515 520 525

Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val Pro
530 535 540

Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
545 550 555

<210> 87
<211> 1674
<212> DNA
<213> Staphylococcus aureus

<400> 87
atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60

gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120

gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180

agcgttaatg ctgcacctaa aacagacaac acaaacgtga gtgatactaa aacaacgtca 240

aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caatatctag cacaacagga aacgacacaa 300

tcagtatcaa caaatgcaac tacggaagaa acaccggtaa ctggtgaagc tactacggca 360

acgaatcaag ctaatacacc ggcaacaact caatcaagca atacaaatgc ggaggaatta 420

gtgaatcaaa caagtaatga aacgacttct aatgatacta atacagtatc atctgtaaat 480

tcacctcaaa attctacaaa tgcggaaaat gtttcaacaa cgcaagatac ttcaactgaa 540

gcaacacctt caaacaatga atcagctcca cagagtacag atgcaagtaa taaagatgta 600

gttaatcaag cggttaatac aagtgcgcct agaatgagag catttagttt agcggctgta 660

gctgcagatg caccggcagc tggcacagat attacgaatc agttgacgaa tgtgacagtt 720

ggtattgact ctggtacgac tgtgtatccg caccaagcag gttatgtcaa actgaattat 780

ggtttttcag tgcctaattc tgctgttaaa ggtgacacat tcaaaataac tgtacctaaa 840

gaattaaact taaatggtgt aacttcaact gctaaagtgc ctccaattat ggctggagat 900

caagtattgg caaatggtgt aatcgataat gatggtaatg ttatttatac atttacagac 960

tatgtaaata ctaaagatga tgttaaagca actttgacta tgcccgctta tattgaccct 1020

gaaaatgtta caaagacagg taatgtgaca ttggctactg gcataggtag tacaacagca 1080

aacaaaacag tattagtaga ttatgaaaaa tatggtaagt tttataactt atctattaaa 1140

ggtacaattg accaaatcga taaaacaaat aatacgtatc gtcagacaat ttatgtcaat 1200

ccaagtggag ataacgttat tgcgccggtt ttaacaggta atttaaaacc aaatacggat 1260

agtaatgcat taatagatca gcaaaataca agtattaaag tatataaagt agataatgca 1320

gctgatttat ctgaaagtta ctttgtgaat ccagaaaact ttgaggatgt cactaatagt 1380

gtgaatatta cattcccaaa tccaaatcaa tataaagtag agtttccaac agacgatgat 1440

caaattacaa caccgtatat tgtagttgtt aatggtcata ttgatccgaa tagcaaaggt 1500

gatttagctt tacgttcaac tttatatggg tataactcga atataatttg gcgctctatg 1560

tcatgggaca acgaagtagc atttaataac ggatcaggtt ctggtgacgg tatcgataaa 1620

cctgttgttc ctgaacaacc tgatgagcct ggtgaaattg aaccaattcc agag 1674

<210> 88
<211> 558
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 88

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

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 Asn Ala
    50                  55                  60

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

Asn Thr Asn Asn Gly Glu Thr Ser Val Ala Gln Tyr Leu Ala Gln Gln
                85                  90                  95

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

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

Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln Thr
    130                 135                 140

Ser Asn Glu Thr Thr Ser Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val Asn
145                 150                 155                 160
```

Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln Asp
165 170 175

Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln Ser
180 185 190

Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr Ser
195 200 205

Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp Ala
210 215 220

Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asn Val Thr Val
225 230 235 240

Gly Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr Val
245 250 255

Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly Asp
260 265 270

Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val Thr
275 280 285

Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu Ala
290 295 300

Asn Gly Val Ile Asp Asn Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr Asp
305 310 315 320

Tyr Val Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Met Pro Ala
325 330 335

Tyr Ile Asp Pro Glu Asn Val Thr Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala
340 345 350

Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp Tyr
355 360 365

Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile Asp
370 375 380

Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val Asn
385 390 395 400

Pro Ser Gly Asp Asn Val Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu Lys

405 410 415

Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser Ile
420 425 430

Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser Tyr Phe
435 440 445

Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile Thr
450 455 460

Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Pro Thr Asp Asp Asp
465 470 475 480

Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Asn Gly His Ile Asp Pro
485 490 495

Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr Asn
500 505 510

Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala Phe
515 520 525

Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val Pro
530 535 540

Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
545 550 555

<210> 89
<211> 1674
<212> DNA
<213> Staphylococcus aureus

<400> 89
atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60

gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120

gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180

agcgttagtg ctgcacctaa aacagacgac acaaacgtga gtgatactaa aacatcgtca 240

aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300

tcagcattaa caaatgcaac tacggaagaa actccggtaa ctggtgaagc tactacggca 360

acgaatcaag ctaatacacc ggcaacaact caatcaagca atacaaatgc ggaggaatta 420

gtgaatcaaa caagtaatga aacgacttct aatgatacta atacagtatc atctgtaaat 480

tcacctcaaa attctacaaa tgcggaaaat gtttcaacaa cgcaagatac ttcaactgaa 540

gcaacacctt caaacaatga atcagctcca cagaatacag atgcaagtaa taaagatgta 600

gttaatcaag cggttaatac aagtgcgcct agaaagagag catttagttt agcggctgta 660

gctgcagatg caccggcagc tggcacagat attacgaatc agttgacaga tgtgaaagtt 720

actattgact ctggtacgac tgtgtatccg caccaagcag gttatgtcaa actgaattat 780

ggtttttcag tgcctaattc tgctgttaaa ggtgacacat tcaaaataac tgtacctaaa 840

gaattaaact taaatggtgt aacttcaact gctaaagtgc caccaattat ggctggagat 900

caagtattgg caaatggtgt aatcgatagt gatggtaatg ttatttatac atttacagac 960

tatgttgata ataaagaaaa tgtaacagct aatattacta tgccagctta tattgaccct 1020

gaaaatgtta caaagacagg taatgtgaca ttgacaactg gcataggaac caatactgct 1080

agtaagacag tattaatcga ctatgagaaa tatggacaat tccataattt atcaattaaa 1140

ggtacgattg atcaaatcga taaaacaaat aatacgtatc gccaaacaat ttatgtcaat 1200

ccaagcggag ataacgttgt gttacctgcc ttaacaggta atttaattcc taatacaaag 1260

agtaatgcgt taatagatgc aaaaaacact gatattaaag tttatagagt cgataatgct 1320

aatgatttat ctgaaagtta ttatgtgaat cctagcgatt ttgaagatgt aactaatcaa 1380

gttagaattt catttccaaa tgctaatcaa tacaaagtag aatttcctac ggacgatgac 1440

caaattacaa caccgtatat tgtagttgtt aatggccata ttgatcctgc tagtacaggt 1500

gatttagcac tacgttcgac attttatggt tatgattcta attttatatg gagatctatg 1560

tcatgggaca acgaagtagc atttaataac ggatcaggtt ctggtgacgg tatcgataaa 1620

ccagttgttc ctgaacaacc tgatgagcct ggtgaaattg aaccaattcc agag 1674

<210> 90
<211> 558
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 90
Met Asn Met Lys Lys Lys Glu Lys His Ala Ile Arg Lys Lys Ser Ile
1 5 10 15

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

223

Asn Thr Asn Asn Gly Glu Thr Ser Val Ala Gln Asn Pro Ala Gln Gln
85 90 95

Glu Thr Thr Gln Ser Ala Leu Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro
100 105 110

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

Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln Thr
130 135 140

Ser Asn Glu Thr Thr Ser Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val Asn
145 150 155 160

Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln Asp
165 170 175

Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln Asn
180 185 190

Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr Ser
195 200 205

Ala Pro Arg Lys Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp Ala
210 215 220

Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asp Val Lys Val
225 230 235 240

Thr Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr Val
245 250 255

Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly Asp
260 265 270

Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val Thr
275 280 285

Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu Ala
290 295 300

Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr Asp
305 310 315 320

Tyr Val Asp Asn Lys Glu Asn Val Thr Ala Asn Ile Thr Met Pro Ala

325 330 335

Tyr Ile Asp Pro Glu Asn Val Thr Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu Thr
340 345 350

Thr Gly Ile Gly Thr Asn Thr Ala Ser Lys Thr Val Leu Ile Asp Tyr
355 360 365

Glu Lys Tyr Gly Gln Phe His Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile Asp
370 375 380

Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val Asn
385 390 395 400

Pro Ser Gly Asp Asn Val Val Leu Pro Ala Leu Thr Gly Asn Leu Ile
405 410 415

Pro Asn Thr Lys Ser Asn Ala Leu Ile Asp Ala Lys Asn Thr Asp Ile
420 425 430

Lys Val Tyr Arg Val Asp Asn Ala Asn Asp Leu Ser Glu Ser Tyr Tyr
435 440 445

Val Asn Pro Ser Asp Phe Glu Asp Val Thr Asn Gln Val Arg Ile Ser
450 455 460

Phe Pro Asn Ala Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Pro Thr Asp Asp Asp
465 470 475 480

Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp Pro
485 490 495

Ala Ser Thr Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Phe Tyr Gly Tyr Asp
500 505 510

Ser Asn Phe Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala Phe
515 520 525

Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val Pro
530 535 540

Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
545 550 555

<210> 91
<211> 1674
<212> DNA
<213> Staphylococcus aureus

<400> 91
atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60
gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120
gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180
agcgttagtg ctgcacctaa aacagacgac acaaacgtga gtgatactaa aacatcgtca 240
aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300
tcatcattaa caaatgcaac tacggaagaa actccggtaa ctggtgaagc tactacggca 360
acgaatcaag ctaatacacc ggcaacaact caatcaagca atacaaatgc ggaggaatta 420
gtgaatcaaa caagtaatga aacgacttct aatgatacta atacagtatc atctgtaaat 480
tcacctcaaa attctacaaa tgcggaaaat gtttcaacaa cgcaagatac ttcaactgaa 540
gcaacacctt caaacaatga atcagctcca cagagtacag atgcaagtaa taaagattta 600
gttaatcaag cggttaatac aagtgcgcct agaatgagag catttagttt agcggcagta 660
gctgcagatg cacctgcagc tggcacagat attacgaatc agttgacaga tgttaaagtt 720
actattgact ctggtacgac tgtgtatccg caccaagcag gttatgtcaa actgaattat 780
ggtttttcag tgcctaattc tgctgttaaa ggtgacacat tcaaaataac tgtacctaaa 840
gaattaaact taaatggtgt aacttcaact gctaaagtgc caccaattat ggctggagat 900
caagtattgg caaatggtgt aatcgatagt gatggtaatg ttatttatac atttacagac 960
tatgttgata ataaaaacga tgttaaagca actttgacca tgcccgctta tattgatcca 1020
gaaaatgtaa cgaaaacagg taatgtaaca ttgacaactg gcataggtag tacaacagca 1080
aacaaaacag tattagtaga ttatgaaaaa tatggtaagt tttataactt atctattaaa 1140
ggtacaattg accaaatcga taaaacaaat aatacgtatc gtcagacaat ttatgtcaat 1200
ccaagtggag ataacgttat tgcgccggtt ttaacaggta atttaaaacc aaatacggat 1260
agtaatgcat taatagatca gcaaaataca agtattaaag tatataaagt agataatgca 1320
gctgatttat ctgaaagtta ctttgtaaat ccagaaaact ttgaggatgt cactaatagt 1380
gtgaatatta cattcccaaa tccaaatcaa tataaagtag agtttaatac gcctgatgat 1440
caaattacaa caccgtatat tgtagttgtt aatggtcata ttgatccgaa tagcaaaggt 1500
gatttagctt tacgttcaac tttatatggg tataactcga atataatttg gcgctctatg 1560
tcatgggaca acgaagtagc atttaataac ggatcaggtt ctggtgacgg tatcgataaa 1620
cctgttgtcc ctgaacaacc tgatgagcct ggtgaaattg aaccaattcc agag 1674

<210> 92
<211> 558
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 92

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

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 Leu Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro
            100                 105                 110

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

Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln Thr
    130                 135                 140

Ser Asn Glu Thr Thr Ser Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val Asn
145                 150                 155                 160

Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln Asp
                165                 170                 175

Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln Ser
            180                 185                 190

Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Leu Val Asn Gln Ala Val Asn Thr Ser
        195                 200                 205

Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp Ala
    210                 215                 220

Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asp Val Lys Val
225                 230                 235                 240

Thr Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr Val
```

245 250 255

Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly Asp
260 265 270

Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val Thr
275 280 285

Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu Ala
290 295 300

Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr Asp
305 310 315 320

Tyr Val Asp Asn Lys Asn Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Met Pro Ala
325 330 335

Tyr Ile Asp Pro Glu Asn Val Thr Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu Thr
340 345 350

Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp Tyr
355 360 365

Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile Asp
370 375 380

Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val Asn
385 390 395 400

Pro Ser Gly Asp Asn Val Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu Lys
405 410 415

Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser Ile
420 425 430

Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser Tyr Phe
435 440 445

Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile Thr
450 455 460

Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro Asp Asp
465 470 475 480

Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp Pro
485 490 495

Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr Asn
500 505 510

Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala Phe
515 520 525

Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val Pro
530 535 540

Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
545 550 555

<210> 93
<211> 1674
<212> DNA
<213> Staphylococcus aureus

<400> 93
atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60

gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120

gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgatccaagt 180

agcgttaatg ctgcacctaa aacagacaac acaaacgtga gtgatactaa aacatcgtca 240

aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300

tcatcattaa caaatgcaac tacggaagaa actccggtaa ctggtgaagc tactacggca 360

acgaatcaag ctaatacacc ggcaacaact caatcaagca atacaaatgc ggaggaatta 420

gtgaatcaaa caagtaatga aacgacttct aatgatacta atacagtatc atctgtaaat 480

tcacctcaaa attctacaaa tgcggaaaat gtttcaacaa cgcaagatac ttcaactgaa 540

gcaacacctt caaacaatga atcagctcca cagagtacag atgcaagtaa taaagattta 600

gttaatcaag cggttaatac aagtgcgcct agaatgagag catttagttt agcggcagta 660

gctgcagatg cacctgcagc tggcacagat attacgaatc agttgacaga tgttaaagtt 720

actattgact ctggtacgac tgtgtatccg caccaagcag gttatgtcaa actgaattat 780

ggtttttcag tgcctaattc tgctgttaaa ggtgacacat tcaaaataac tgtacctaaa 840

gaattaaact taaatggtgt aacttcaact gctaaagtgc ctccaattat ggccggagat 900

caagtattgg caaatggtgt aatcgatagt gatggtaatg ttatttatac atttacagac 960

tatgttgata ctaaagaaaa tgtaacagct aatattacta tgccagctta tattgaccct 1020

gaaaatgtta caaagacagg taatgtaaca ttgacaactg gcataggtag tacaacagca 1080

aacaaaacag tattagtaga ttatgaaaaa tatggtaagt tttataactt atctattaaa 1140

ggtacaattg accaaatcga taaaacaaat aatacgtatc gtcagacaat ttatgtcaat 1200

ccaagtggag ataacgttat tgcgccggtt ttaacaggta atttaaaacc caatacggat 1260

agtaatgcat taatagatca gcaaaataca agtattaaag tatataaagt agataatgca 1320

gctgatttat ctgaaagtta ctttgtaaat ccagaaaact ttgaggatgt cactaatagt 1380

gtgaatatta cattcccaaa tccaaatcaa tataaagtag agtttaatac gcctgatgat 1440

caaattacaa caccgtatat tgtagttgtt aatggtcata ttgatccgaa tagcaaaggt 1500

gatttagctt tacgttcaac tttatatggg tataactcga atataatttg gcgctctatg 1560

tcatgggaca acgaagtagc atttaataac ggatcaggtt ctggtgacgg tatcgataaa 1620

cctgttgtcc ctgaacaacc tgatgagcct ggtgaaattg aaccaattcc agag 1674

<210> 94
<211> 558
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 94

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

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 Pro Ser Ser Val Asn Ala
50 55 60

Ala Pro Lys Thr Asp Asn 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 Leu Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro
100 105 110

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

Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln Thr
130 135 140

Ser Asn Glu Thr Thr Ser Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val Asn
145 150 155 160

Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln Asp

165 170 175

Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln Ser
180 185 190

Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Leu Val Asn Gln Ala Val Asn Thr Ser
195 200 205

Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp Ala
210 215 220

Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asp Val Lys Val
225 230 235 240

Thr Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr Val
245 250 255

Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly Asp
260 265 270

Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val Thr
275 280 285

Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu Ala
290 295 300

Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr Asp
305 310 315 320

Tyr Val Asp Thr Lys Glu Asn Val Thr Ala Asn Ile Thr Met Pro Ala
325 330 335

Tyr Ile Asp Pro Glu Asn Val Thr Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu Thr
340 345 350

Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp Tyr
355 360 365

Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile Asp
370 375 380

Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val Asn
385 390 395 400

Pro Ser Gly Asp Asn Val Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu Lys
405 410 415

Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser Ile
420 425 430

Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser Tyr Phe
435 440 445

Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile Thr
450 455 460

Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro Asp Asp
465 470 475 480

Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp Pro
485 490 495

Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr Asn
500 505 510

Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala Phe
515 520 525

Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val Pro
530 535 540

Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
545 550 555

<210> 95
<211> 1677
<212> DNA
<213> Staphylococcus aureus

<400> 95
atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60

gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120

gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180

agcgttagtg ctgcacctaa aacagacgac acaaacgtga gtgatactaa aacatcgtca 240

aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatctag cacaacagga aacgacacaa 300

tcatcatcaa caaatgcaac tacggaagaa acgccggtaa ctggtgaagc tactactacg 360

acaacgaatc aagctaatac accggcaaca actcaatcaa gcaatacaaa tgcggaggaa 420

ttagtgaatc aaacaagtaa tgaaacgact tctaatgata ctaatacagt atcatctgta 480

aattcacctc aaaattctac aaatgcggaa aatgtttcaa caacgcaaga tacttcaact 540

gaagcaacac cttcaaacaa tgaatcagct ccacagagta cagatgcaag taataaagat 600

gtagttaatc aagcggttaa tacaagtgcg cctagaatga gagcatttag tttagcggca 660

gtagctgcag atgcaccggc agctggcaca gatattacga atcagttgac gaatgtgaca 720

gttggtattg actctggtac gactgtgtat ccgcaccaag caggttatgt caaactgaat 780

tatggttttt cagtgcctaa ttctgctgtt aaaggtgaca cattcaaaat aactgtacct 840

aaagaattaa acttaaatgg tgtaacttca actgctaaag tgccaccaat tatggctgga 900

gatcaagtat tggcaaatgg tgtaatcgat agtgatggta atgttattta tacatttaca 960

gactatgtaa atactaaaga tgatgttaaa gcaactttga ccatgcccgc ttatattgac 1020

cctgaaaatg ttacaaagac aggtaatgtg acattggcta ctggcatagg aaatacaaca 1080

gcaaacaaaa cagtattagt agattatgaa aaatatggta agttttataa cttatctatt 1140

aaaggtacaa ttgaccaaat cgataaaaca aataatacgt atcgtcagac aatttatgtc 1200

aatccaagtg gagataacgt tattgcgccg gttttaacag gtaatttaaa accaaatacg 1260

gatagtaatg cattaataga tcagcaaaat acaagtatta aagtatataa agtagataat 1320

gcagctgatt tatctgaaag ttactttgtg aatccagaaa actttgagga tgtcactaat 1380

agtgtgaata ttacattccc aaatccaaat caatataaag tagagtttaa tacgcctgat 1440

gatcaaatta caacaccgta tatagtagtt gttaatggtc atattgatcc gaatagcaaa 1500

ggtgatttag ctttacgttc aactttatat gggtataact cgaatataat ttggcgctct 1560

atgtcatggg acaacgaagt agcatttaat aacggatcag gttctggtga cggtatcgat 1620

aaacctgttg ttcctgaaca acctgatgag cctggtgaaa ttgaaccaat tccagag 1677

<210> 96
<211> 559
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 96

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

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 Leu Ala Gln Gln
```

285

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

Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr
195 200 205

Ser Ala 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 Asn Val Thr
225 230 235 240

Val Gly 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

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 Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr Leu 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

Ala Thr Gly Ile Gly Asn Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp
355 360 365

Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr 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 Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu
405 410 415

Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser
420 425 430

Ile Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser Tyr
435 440 445

Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile
450 455 460

Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro 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 Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr
500 505 510

Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala
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
545 550 555

<210> 97
<211> 1674
<212> DNA
<213> Staphylococcus aureus

<400> 97
atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60

gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120

gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180

agcgttagtg ctgcacctaa aacagacgac acaaacgtga gtgatactaa aacatcgtca 240

aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300

tcagcattaa caaatgcaac tacggaagaa actccgttaa ctggtgaagc tactacggca 360

acgaatcaag ctaatacacc ggcaacaact caatcaagca atacaaatgc ggaggaatta 420

gtgaatcaaa caagtaatga aacgacttct aatgatacta atacagtatc atctgtaaat 480

tcacctcaaa attctacaaa tgcggaaaat gtttcaacaa cgcaagatac ttcaactgaa 540

gcaacacctt caaacaatga atcagctcca cagagtacag atgcaagtaa taaagatgta 600

gttaatcaag cggttaatac aagtgcgcct agaatgagag catttagttt agcggcagta 660

gctgcagatg caccggcagc tggcacagat attacgaatc agttgacaga tgtgaaagtt 720

actattgact ctggtacgac tgtgtatccg caccaagcag gttatgtcaa actgaattat 780

ggtttttcag tgcctaattc tgctgttaaa ggtgacacat tcaaaataac tgtacctaaa 840

gaattaaact taaatggtgt aacttcaact gctaaagtgc ctccaattat ggccggagat 900

caagtattgg caaatggtgt aatcgatagt gatggtaatg ttatttatac atttacagac 960

tatgttgata ataaaaacga tgttaaagca acactaactg ttcctgcata cattgatcca 1020

gaaaatgtaa cgaaaacagg taatgtaaca ttgacaactg gcataggaac caatactgct 1080

agtaagacag ttttaatcga ctatgagaaa tatggacaat tccataattt atcaattaaa 1140

ggtacaattg atcaaatcga caaaacaaac aatacgtatc gtcaaacgat ttatgtcaat 1200

ccaagtggag acaatgttgt attaccagtg ttaactggta atctaattcc taagagtaat 1260

agtaatgctt taatagatgc caacaatact aatattaaag tttataaagt ggataatgct 1320

aatgatttat ctgaaagtta ttatgtgaat cctagcgatt ttgaagatgt aactaatcaa 1380

gttagaattt catttccaaa tgctaatcaa tacaaagtag aatttcctac ggacgatgac 1440

caaattacaa caccgtatat tgtagttgtt aatggccata ttgatcctgc tagtacaggt 1500

gatttagcac tacgttcgac attttatggt tatgattcta attttatatg gagatctatg 1560

tcatgggaca acgaagtagc atttaataac ggatcaggtt ctggtgacgg tatcgataaa 1620

ccagttgttc ctgaacaacc tgatgagcct ggtgaaattg aaccaattcc agag 1674

<210> 98
<211> 558
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 98
Met Asn Met Lys Lys Lys Glu Lys His Ala Ile Arg Lys Lys Ser Ile

1 5 10 15

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 Ala Leu Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro
100 105 110

Leu Thr Gly Glu Ala Thr Thr Ala Thr Asn Gln Ala Asn Thr Pro Ala
115 120 125

Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln Thr
130 135 140

Ser Asn Glu Thr Thr Ser Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val Asn
145 150 155 160

Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln Asp
165 170 175

Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln Ser
180 185 190

Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr Ser
195 200 205

Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp Ala
210 215 220

Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asp Val Lys Val
225 230 235 240

Thr Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr Val
245 250 255

Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly Asp
260 265 270

Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val Thr
275 280 285

Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu Ala
290 295 300

Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr Asp
305 310 315 320

Tyr Val Asp Asn Lys Asn Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Val Pro Ala
325 330 335

Tyr Ile Asp Pro Glu Asn Val Thr Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu Thr
340 345 350

Thr Gly Ile Gly Thr Asn Thr Ala Ser Lys Thr Val Leu Ile Asp Tyr
355 360 365

Glu Lys Tyr Gly Gln Phe His Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile Asp
370 375 380

Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val Asn
385 390 395 400

Pro Ser Gly Asp Asn Val Val Leu Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu Ile
405 410 415

Pro Lys Ser Asn Ser Asn Ala Leu Ile Asp Ala Asn Asn Thr Asn Ile
420 425 430

Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Asn Asp Leu Ser Glu Ser Tyr Tyr
435 440 445

Val Asn Pro Ser Asp Phe Glu Asp Val Thr Asn Gln Val Arg Ile Ser
450 455 460

Phe Pro Asn Ala Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Pro Thr Asp Asp Asp
465 470 475 480

Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp Pro
485 490 495

Ala Ser Thr Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Phe Tyr Gly Tyr Asp
500 505 510

Ser Asn Phe Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala Phe
515 520 525

Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val Pro
530 535 540

Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
545 550 555

<210> 99
<211> 1674
<212> DNA
<213> Staphylococcus aureus

<400> 99
atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60

gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120

gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180

agcgttagtg ctgcacctaa aacagacgac acaaacgtga gtgatactaa aacatcgtca 240

aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacaaga aacgacacaa 300

tcagcattaa caaatgcaac tacggaagaa actccggtaa ctggtgaagc tactacggca 360

acgaatcaag ctaatacacc ggcaacaact caatcaagca atacaaatgc ggaggaatta 420

gtgaatcaaa caagtaatga aacgacttct aatgatacta atacagtatc atctgtaaat 480

tcacctcaaa attctacaaa tgcggaaaat gtttcaacaa cgcaagatac ttcaactgaa 540

gcaacacctt caaacaatga atcagctcca cagaatacag atgcaagtaa taaagatgta 600

gttaatcaag cggttaatac aagtgcgcct agaaagagag catttagttt agcggctgta 660

gctgcagatg caccggcagc tggcacagat attacgaatc agttgacaga tgtgaaagtt 720

actattgact ctggtacgac tgtgtatccg caccaagcag gttatgtcaa actgaattat 780

ggtttttcag tgcctaattc tgctgttaaa ggtgacacat tcaaaataac tgtacctaaa 840

gaattaaact taaatggtgt aacttcaact gctaaagcgc caccaattat ggctggagat 900

caagtattgg caaatggtgt aatcgatagt gatggtaatg ttatttatac atttacagac 960

tatgttgata ataaagaaaa tgtaacagct aatattacta tgccagctta tattgaccct 1020

gaaaatgtta caaagacagg taatgtgaca ttgacaactg gcataggaac caatactgct 1080

agtaagacag tattaatcga ctatgagaaa tatggacaat tccataattt atcaattaaa 1140

ggtacgattg atcaaatcga taaaacaaat aatacgtatc gccaaacaat ttatgtcaat 1200

ccaagcggag ataacgttgt gttacctgcc ttaacaggta atttaattcc taatacaaag 1260

agtaatgcgt taatagatgc aaaaaacact gatattaaag tttatagagt cgataatgct 1320

aatgatttat ctgaaagtta ttatgtgaat cctagcgatt ttgaagatgt aactaatcaa 1380

gttagaattt catttccaaa tgctaatcaa tacaaagtag aatttcctac ggacgatgac 1440

caaattacaa caccgtatat tgtagttgtt aatggccata ttgatcctgc tagtacaggt 1500

gatttagcac tacgttcgac attttatggt tatgattcta attttatatg gagatctatg 1560

tcatgggaca acgaagtagc atttaataac ggatcaggtt ctggtgacgg tatcgataaa 1620

ccagttgttc ctgaacaacc tgatgagcct ggtgaaattg aaccaattcc agag 1674

<210> 100
<211> 558
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 100

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

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 Ala Leu Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro
            100                 105                 110

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

Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln Thr
    130                 135                 140

Ser Asn Glu Thr Thr Ser Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val Asn
145                 150                 155                 160

Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln Asp
                165                 170                 175
```

Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln Asn
180 185 190

Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr Ser
195 200 205

Ala Pro Arg Lys Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp Ala
210 215 220

Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asp Val Lys Val
225 230 235 240

Thr Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr Val
245 250 255

Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly Asp
260 265 270

Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val Thr
275 280 285

Ser Thr Ala Lys Ala Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu Ala
290 295 300

Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr Asp
305 310 315 320

Tyr Val Asp Asn Lys Glu Asn Val Thr Ala Asn Ile Thr Met Pro Ala
325 330 335

Tyr Ile Asp Pro Glu Asn Val Thr Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu Thr
340 345 350

Thr Gly Ile Gly Thr Asn Thr Ala Ser Lys Thr Val Leu Ile Asp Tyr
355 360 365

Glu Lys Tyr Gly Gln Phe His Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile Asp
370 375 380

Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val Asn
385 390 395 400

Pro Ser Gly Asp Asn Val Val Leu Pro Ala Leu Thr Gly Asn Leu Ile
405 410 415

Pro Asn Thr Lys Ser Asn Ala Leu Ile Asp Ala Lys Asn Thr Asp Ile
420 425 430

Lys Val Tyr Arg Val Asp Asn Ala Asn Asp Leu Ser Glu Ser Tyr Tyr
435 440 445

Val Asn Pro Ser Asp Phe Glu Asp Val Thr Asn Gln Val Arg Ile Ser
450 455 460

Phe Pro Asn Ala Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Pro Thr Asp Asp Asp
465 470 475 480

Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp Pro
485 490 495

Ala Ser Thr Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Phe Tyr Gly Tyr Asp
500 505 510

Ser Asn Phe Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala Phe
515 520 525

Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val Pro
530 535 540

Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
545 550 555

<210> 101
<211> 1677
<212> DNA
<213> Staphylococcus aureus

<400> 101
atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60

gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120

gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180

agcgttagtg ctgcacctaa aacagacgac acaaacgtga gtgatactaa aacatcgtca 240

aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300

tcatcatcaa caaatgcaac tacggaagaa acgccggtaa ctggtgaagc tactactacg 360

acaacgaatc aagctaatac accggcaaca actcaatcaa gcaatacaaa tgcggaggaa 420

ttagtgaatc aaacaagtaa tgaaacgact tctaatgata ctaatacagt atcatctgta 480

aattcacctc aaaattctac aaatgcggaa aatgtttcaa caacgcaaga tacttcaact 540

gaagcaacac cttcaaacaa tgaatcagct ccacagagta cagatgcaag taataaagat 600

gtagttaatc aagcggttaa tacaagtgcg cctagaatga gagcatttag tttagcggca 660

gtagctgcag atgcaccggc agctggcaca gatattacga atcagttgac gaatgtgaca 720

gttggtattg actctggaga tacagtttat ccgcaccaag caggctatgt caaactgaat 780

tatggttttt cagtgcctaa ttctgctgtt aaaggtgaca cattcaaaat aactgtacct 840

aaagaattaa acttaaatgg tgtaacttca actgctaaag tgccaccaat tatggctgga 900

gatcaagtat tggcaaatgg tgtaatcgat agtgatggta atgttattta tacatttaca 960

gactatgtaa atactaaaga tgatgttaaa gcaactttga ccatgcccgc ttatattgac 1020

cctgaaaatg ttacaaagac aggtaatgtg acattggcta ctggcatagg aaatacaaca 1080

gcaaacaaaa cagtattagt agattatgaa aaatatggta agttttataa cttatctatt 1140

aaaggtacaa ttgaccaaat cgataaaaca aataatacgt atcgtcagac aatttatgtc 1200

aatccaagtg gagataacgt tattgcgccg gttttaacag gtaatttaaa accaaatacg 1260

gatagtaatg cattaataga tcagcaaaat acaagtatta aagtatataa agtagataat 1320

gcagctgatt tatctgaaag ttactttgtg aatccagaaa actttgagga tgtcactaat 1380

agtgtgaata ttacattccc aaatccaaat caatataaag tagagtttaa tacgcctgat 1440

gatcaaatta caacaccgta tatagtagtt gttaatggtc atattgatcc gaatagcaaa 1500

ggtgatttag ctttacgttc aactttatat gggtatgact caaggtttgt atggagatct 1560

atgtcatggg acaacgaagt agcatttaat aacggatcag gttctggtga cggtatcgat 1620

aaaccagttg ttcctgaaca acctgatgag cctggtgaaa ttgaaccaat tccagag 1677

<210> 102
<211> 559
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 102

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

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

Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr
195 200 205

Ser Ala 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 Asn Val Thr
225 230 235 240

Val Gly Ile Asp Ser Gly Asp 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

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 Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr Leu 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

Ala Thr Gly Ile Gly Asn Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp
355 360 365

Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr 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 Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu
405 410 415

Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser
420 425 430

Ile Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser Tyr
435 440 445

Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile
450 455 460

Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro 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 Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr
500 505 510

Asp Ser Arg Phe Val Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala
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
545 550 555

<210> 103
<211> 1677
<212> DNA
<213> Staphylococcus aureus

<400> 103
atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60

gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120

gaaaatagtg ttacgcaatc cgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180

agcgttagtg ctgcacctaa aacagtcgac acaaacgtga gtgatactaa aacaacgtca 240

aacactaata gtggcgaaac aagtgtggcg caaaatccgg cacaacagga aacgacacaa 300

tcagcatcaa caaatgcaac tacggaagaa actccggcaa ctggtgaagc tactactacg 360

gcaacgaatc aagctaatac accggcaaca actcaatcaa gcaatacaaa tgcggaggaa 420

ttagtgaatc aaacaaataa tgaaacgact tctaatgata ctaatacagt atcatctgta 480

aattcacctc aaaattctac aaatgcggaa aatgtttcaa caacgcaaga tacttcaact 540

gaagcaacac cttcaaacaa tgaatcagct ccacagagta cagatgcaag taataaagat 600

gtagttaatc aagcggttaa tacaagtgcg cctagaatga gagcatttag tttagcggca 660

gtagctgcag atgcaccggc tgctggcaca gatattacga atcagttgac agatgtgaaa 720

gttactattg actctggtac gactgtgtat ccgcaccaag caggttatgt caaactgaat 780

tatggttttt cagtccctaa ttctgctgtt aaaggtgaca cattcaaaat aactgtacct 840

aaagaattaa acttaaatgg tgtaacttca actgctaagg tgccaccaat tatggccgga 900

gatcaagtat tggcaaatgg tgtaatcgat agtgatggta atgttattta tacatttaca 960

gactatgttg ataataaaga aaatgtaaca gctaatatta ctatgccagc ttatattgac 1020

cctgaaaatg ttacaaagac aggtaatgtg acattgacaa ctggcatagg aaccaatact 1080

gctagtaaga cagtattaat cgactatgag aaatatggac aattccataa tttatcaatt 1140

aaaggtacga ttgatcaaat cgataaaaca ataatacgt atcgccaaac aatttatgtc 1200

aatccaagcg gagataacgt tgtgttacct gccttaacag gtaatttaat tcctaataca 1260

aagagtaatg cgttaataga tgcaaaaaac actgatatta aagtttatag agtcgataat 1320

gctaatgatt tatctgaaag ttattatgtg aatcctagcg attttgaaga tgtaactaat 1380

caagttagaa tttcatttcc aaatgctaat caatacaaag tagaatttcc tacggacgat 1440

gaccaaatta caacaccgta tattgtagtt gttaatggcc atattgatcc tgctagtaca 1500

ggtgatttag cactacgttc gacattttat ggttatgatt ctaattttat atggagatct 1560

atgtcatggg acaacgaagt agcatttaat aacggatcag gctctggtga cggtatcgat 1620

aaaccagttg ttcctgaaca acctgatgag cctggtgaaa ttgaaccaat tccagag 1677

<210> 104
<211> 559
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 104
Met Asn Met Lys Lys Lys Glu Lys His Ala Ile Arg Lys Lys Ser Ile
1 5 10 15

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

Asn Thr Asn Ser Gly Glu Thr Ser Val Ala Gln Asn Pro Ala Gln Gln
85 90 95

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

Ala Thr Gly Glu Ala Thr Thr Thr Ala 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 Asn 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

Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr
195 200 205

Ser Ala 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

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
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
545 550 555

<210> 105
<211> 1677
<212> DNA
<213> Staphylococcus aureus

<400> 105
atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60
gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120
gaaaatagtg ttacgcaatc cgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa taatccaagt 180
agcgttaacg ctgcacctaa aacagacaac acaaacgtga gtgatactaa aacaacgtca 240
aacactaata atagcgaaac gagtgtggca caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300
tcagcatcaa caaatgcaac tacggaagaa acaccggtaa ctggtgaagg tactactacg 360
gcaacgaatc aagctaatac accggcagca actcaatcaa acaatacaaa tgcggaggaa 420
ttagtgaatc aaacaagtaa tgaaacgact tctaatgata ctaatacagt atcatctgta 480
aattcacctc aaaattctac aaatgcggaa aatgtttcaa caacgcaaga cacttcaact 540
gaagcaacac cttcaaacaa tgaatcagct ccacagagta cagatgcaag taataaagat 600
gtagttagtc aagccgttaa tccaagtgcg cctagaatga gagcatttag tttagcggct 660
gtagctgcag atgcaccggc tgctggcaca gatattacga atcagttgac agatgttact 720
gttggtattg aatctggaga tacagtttat ccgcaccaag caggttatgt caaactgaat 780
tatggttttt ccgtgcctaa ttctgctgtt aaaggtgaca cattcaaaat aactgtacct 840
aaagaattaa acttaaatgg tgtaacttca actgctaaag ttcctccaat tatggctgga 900
gatcaagtat tagctaatgg tgtaatcgat agtgatggta atgttattta tacatttaca 960
gactatgtaa atactaaaga tgatgttaaa gcaacactaa ctgtgcctgc atacattgac 1020
cctgaatatg ttacacatac tggtaatgtg acattggcta ctggcatagg aaatacaaca 1080
gcaaacaaaa cagtattagt agattatgaa aaatatggta agttttataa cttatctatt 1140
aaaggtacaa ttgaccaagt cgataaaaca aataatacgt atcgtcagac aatttatgtc 1200
aatccaagtg gagataacgt tattgcaccg gttttaacag gtaatttaaa accaaatacg 1260
gatagtaatg cattaataga tcagcaaaat acaagtatta aagtatataa agtagataat 1320
gcagctgatt tatctgaaag ttactttgtg aatccagaaa actttgagga tgtcactaat 1380
agtgtaaata ttacattccc aaatccaaat caatataaag tagagtttaa tacgcctgat 1440

gatcaaatta caacaccgta tattgtagtt gttaatggtc atattgatcc gaatagcaaa 1500

ggtgatttag ctttacgttc aactttatat ggatataact caaatataat ttggcgctct 1560

atgtcatggg acaacgaagt agcatttaat aacggatcag gttctggtga cggtatcgat 1620

aaacctgttg ttcctgaaca acctgatgag ccgggtgaaa ttgaaccaat tccagag 1677

<210> 106
<211> 559
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 106

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

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 Asn Pro Ser Ser Val Asn Ala
    50                  55                  60

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

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

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

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

Ala Ala Thr Gln Ser Asn 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
```

300

Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Ser Gln Ala Val Asn Pro
195 200 205

Ser Ala 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 Thr
225 230 235 240

Val Gly Ile Glu Ser Gly Asp 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

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 Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Val Pro
325 330 335

Ala Tyr Ile Asp Pro Glu Tyr Val Thr His Thr Gly Asn Val Thr Leu
340 345 350

Ala Thr Gly Ile Gly Asn Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp
355 360 365

Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile
370 375 380

Asp Gln Val Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val
385 390 395 400

Asn Pro Ser Gly Asp Asn Val Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu
405 410 415

Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser
420 425 430

Ile Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser Tyr
435 440 445

Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile
450 455 460

Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro Asp
465 470 475 480

Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Asn Gly His Ile Asp
485 490 495

Pro Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr
500 505 510

Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala
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
545 550 555

<210> 107
<211> 1677
<212> DNA
<213> Staphylococcus aureus

<400> 107
atgaatatga agaaacaaga aaaacacgca attcgtaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60

gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120

gaaaatagta tgacacaaac ggaaaatacg agtaatgaga gcaaaagtaa tgatccaagt 180

agcgttaatg ctgcacctaa aacagacaac acaaacgtga gtgattctaa tacaacgaca 240

aacactaata gtgacgaaac gaatgtagcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300

tcagcatcaa caaatgcaac tacagaagaa acaccggtaa ctggtgaagt tactactacg 360

gcaacgaatc aagctaatac accggcaaca actcaatcaa gcaatacaaa tgcggaagaa 420

tcagtgaatc aaacaagtaa tgaaacgact tctaatgata ctaatacagt atcatctgta 480

aattcacctc aaaattctac aaatgcggaa aatgtttcaa caacgcaaga catttcaact 540

gaagcaacac cttcaaacaa tgaatcagct ccacagagta cagatgcaag taataaagat 600

gtagttaatc aagcggttaa tacaagtgcg cctagaatga gagcatttag tttagcggct 660

gtagctgcag atgcaccggc tgctggcaaa gatattacga atcagttgac gaatgtgaca 720

gttggtattg actctggaga tacagtttat ccgcaccaag caggctatgt caaactgaat 780

tatgggttct cagtaccaaa tgaggctgtt caaggtgaca cattcaaaat aactgtgccc 840

aaagaattaa acttaaatgg tgtaacttca actgctaaag tgccaccaat tatggccgga 900

gatcaagtat tggcaaatgg tgtaatcgat agtgatggta atgttattta tacatttaca 960

gactatgtaa atactaaaga tgatgttaaa gcaactttga ccatgcccgc ttatattgac 1020

cctgaaaatg ttacaaagac aggtaatgtg acattggcta ctggcatagg tagtacaaca 1080

gcaaacaaaa cagtattagt agattatgaa aaatatggta agttttataa cttatctatt 1140

aaaggtacaa ttgaccaaat cgataaaaca aataatacgt atcgtcagac aatttatgtc 1200

aatccaagtg gagataacgt tattgcgccg gttttaacag gtaatttaaa accaaatacg 1260

gatagtaatg cattaataga tgcacaaaat actagtatta aagtatataa agttgataat 1320

gcatcagact tgtctgaaag ttattatgtg aatccagata actttgaaga tgtcactgat 1380

agtgtgaata ttacattccc aaatccaaat caatataaag tagagttcaa tacgcctgat 1440

gatcaaataa caacaccata tattgtagtt gttaatgggc atattgatcc taatagtaaa 1500

ggtgatttag ctttacgttc aactttatat ggatataatt cgaatataat ttggcgatca 1560

atgtcatggg ataatgaagt agcatttaat aacggatcag gttttggtga cggtatcgat 1620

aaacctgttg ttcctgaaca acctgatgag ccgggtgaaa ttgaaccaat tccagag 1677

<210> 108
<211> 559
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 108

Met	Asn	Met	Lys	Lys	Gln	Glu	Lys	His	Ala	Ile	Arg	Lys	Lys	Ser	Ile
1				5				10					15		
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	Met	Thr	Gln	Thr	Glu
		35					40					45			
Asn	Thr	Ser	Asn	Glu	Ser	Lys	Ser	Asn	Asp	Pro	Ser	Ser	Val	Asn	Ala
	50					55					60				
Ala	Pro	Lys	Thr	Asp	Asn	Thr	Asn	Val	Ser	Asp	Ser	Asn	Thr	Thr	Thr
65					70					75					80
Asn	Thr	Asn	Ser	Asp	Glu	Thr	Asn	Val	Ala	Gln	Asn	Pro	Ala	Gln	Gln
				85					90					95	
Glu	Thr	Thr	Gln	Ser	Ala	Ser	Thr	Asn	Ala	Thr	Thr	Glu	Glu	Thr	Pro
			100					105					110		

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

Ala Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Ser 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 Ile Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln
180 185 190

Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr
195 200 205

Ser Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp
210 215 220

Ala Pro Ala Ala Gly Lys Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asn Val Thr
225 230 235 240

Val Gly Ile Asp Ser Gly Asp Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr
245 250 255

Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Glu Ala Val Gln Gly
260 265 270

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 Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr Leu 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

Ala Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp
355 360 365

Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr 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 Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu
405 410 415

Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Ala Gln Asn Thr Ser
420 425 430

Ile Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ser Asp Leu Ser Glu Ser Tyr
435 440 445

Tyr Val Asn Pro Asp Asn Phe Glu Asp Val Thr Asp Ser Val Asn Ile
450 455 460

Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro 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 Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr
500 505 510

Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala
515 520 525

Phe Asn Asn Gly Ser Gly Phe 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
545 550 555

<210> 109
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence.

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 109
cacaaaattt acgaatagaa agaaacgag 29

<210> 110

<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 110
aaaatattgg agataccaat attttaggtt g 31

<210> 111
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 111
tttcttggat ccggtactgg tggtaaacaa agcagtg 37

<210> 112
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 112
tttcttgcat gcttatttca tgcttccgtg tacagtttc 39

<210> 113
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 113
tttcttccat gggtactggt ggtaaacaaa gcag 34

<210> 114
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 114
tttcttgctc agcattattt catgcttccg tgtacag 37

<210> 115
<211> 309
<212> PRT
<213> Staphylococcus epidermidis

<400> 115

```
Val Lys Lys Ile Leu Ala Leu Ala Ile Ala Phe Leu Ile Ile Leu Ala
1               5                  10                  15

Ala Cys Gly Asn His Ser Asn His Glu His His Ser His Glu Gly Lys
            20                  25                  30

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

Val Gly Gly Asn Lys Val Asp Val His Ser Ile Val Pro Val Gly Gln
    50                  55                  60

Asp Pro His Glu Tyr Glu Val Lys Pro Lys Asp Ile Lys Ala Leu Thr
65                  70                  75                  80

Asp Ala Asp Val Val Phe Tyr Asn Gly Leu Asn Leu Glu Thr Gly Asn
                85                  90                  95

Gly Trp Phe Glu Lys Ala Leu Asp Gln Ala Gly Lys Ser Thr Lys Asp
            100                 105                 110

Lys Asn Val Ile Ala Ala Ser Asn Asn Val Lys Pro Ile Tyr Leu Asn
        115                 120                 125

Gly Glu Glu Gly Asn Lys Asn Lys Gln Asp Pro His Ala Trp Leu Ser
    130                 135                 140

Leu Glu Asn Gly Ile Lys Tyr Val Lys Thr Ile Gln Lys Ser Leu Glu
145                 150                 155                 160

His His Asp Lys Lys Asp Lys Ser Thr Tyr Glu Lys Gln Gly Asn Ala
                165                 170                 175

Tyr Ile Ser Lys Leu Glu Glu Leu Asn Lys Asp Ser Lys Asn Lys Phe
            180                 185                 190

Asp Asp Ile Pro Lys Asn Gln Arg Ala Met Met Thr Ser Glu Gly Ala
        195                 200                 205

Phe Lys Tyr Phe Ala Gln Gln Phe Asp Val Lys Pro Gly Tyr Ile Trp
    210                 215                 220

Glu Ile Asn Thr Glu Lys Gln Gly Thr Pro Gly Gln Met Lys Gln Ala
225                 230                 235                 240

Ile Lys Phe Val Lys Asp Asn His Leu Lys His Leu Leu Val Glu Thr
```

245 250 255

Ser Val Asp Lys Lys Ala Met Gln Ser Leu Ser Glu Glu Thr Lys Lys
260 265 270

Asp Ile Tyr Gly Glu Val Phe Thr Asp Ser Ile Gly Lys Ala Gly Thr
275 280 285

Lys Gly Asp Ser Tyr Tyr Lys Met Met Lys Ser Asn Ile Asp Thr Ile
290 295 300

His Gly Ser Met Lys
305

<210> 116
<211> 930
<212> DNA
<213> Staphylococcus epidermidis

<400> 116
gtgaaaaaaa ttctcgcttt agcaatagca tttttaatta tccttgccgc atgtgggaat 60

cacagtaacc atgaacatca ctcacatgaa ggaaaattaa aagttgtaac tacaaactct 120

attctctatg acatggttaa acgtgtcggt ggaaataagg tcgatgttca tagcatcgtt 180

ccagtaggac aagatccaca tgaatatgag gttaaaccta aagatattaa agcattaaca 240

gatgctgacg ttgtatttta taatggttta aacctagaaa ctggaaatgg ttggtttgaa 300

aaagcacttg accaagcagg aaaatcaaca aaagataaaa atgtgatagc agcatcaaat 360

aatgttaaac caatatactt aaatggtgag gaaggtaaca aaaacaaaca agatccacat 420

gcatggttaa gtttagagaa tggaattaaa tacgtaaaaa caatacaaaa atcactagaa 480

catcatgata aaaaagataa gtctacatat gaaaaacaag ggaatgcata tatatcaaaa 540

ttagaagaac ttaataaaga tagtaaaaat aaatttgatg acatacccaa aaatcaacgt 600

gccatgatga caagtgaagg tgcatttaaa tattttgctc aacaattcga tgttaaacca 660

ggttatattt gggagataaa cacagaaaaa caaggtacac ctggtcaaat gaaacaagcc 720

attaaatttg ttaaagataa tcatttaaaa catttattag tcgaaacaag cgtagataaa 780

aaagctatgc aaagtttatc agaagaaact aagaaagata tttatggtga agtatttacc 840

gactctatag gtaaggcagg tactaaaggt gactcatact ataaaatgat gaaatctaat 900

attgatacaa tacatggtag tatgaaataa 930

<210> 117
<211> 510
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 117

```
Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Ala Ser Glu Gln Ser
1               5                  10                  15

Asn Asp Thr Thr Gln Ser Ser Lys Asn Asn Ala Ser Ala Asp Ser Glu
            20                  25                  30

Lys Asn Asn Met Ile Glu Thr Pro Gln Leu Asn Thr Thr Ala Asn Asp
        35                  40                  45

Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn Val Asp Ser Thr
    50                  55                  60

Thr Lys Pro Met Ser Thr Gln Thr Ser Asn Thr Thr Thr Thr Glu Pro
65                  70                  75                  80

Ala Ser Thr Asn Glu Thr Pro Gln Pro Thr Ala Ile Lys Asn Gln Ala
                85                  90                  95

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

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

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

Gln Thr Ile Ser Asn Ala Gln Gly Thr Ser Lys Pro Ser Val Arg Thr
145                 150                 155                 160

Arg Ala Val Arg Ser Leu Ala Val Ala Glu Pro Val Val Asn Ala Ala
                165                 170                 175

Asp Ala Lys Gly Thr Asn Val Asn Asp Lys Val Thr Ala Ser Asn Phe
            180                 185                 190

Lys Leu Glu Lys Thr Thr Phe Asp Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Phe
        195                 200                 205

Met Ala Ala Asn Phe Thr Val Thr Asp Lys Val Lys Ser Gly Asp Tyr
    210                 215                 220

Phe Thr Ala Lys Leu Pro Asp Ser Leu Thr Gly Asn Gly Asp Val Asp
225                 230                 235                 240

Tyr Ser Asn Ser Asn Asn Thr Met Pro Ile Ala Asp Ile Lys Ser Thr
                245                 250                 255
```

Asn Gly Asp Val Val Ala Lys Ala Thr Tyr Asp Ile Leu Thr Lys Thr
260 265 270

Tyr Thr Phe Val Phe Thr Asp Tyr Val Asn Asn Lys Glu Asn Ile Asn
275 280 285

Gly Gln Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
290 295 300

Ser Gly Thr Tyr Asp Ala Asn Ile Asn Ile Ala Asp Glu Met Phe Asn
305 310 315 320

Asn Lys Ile Thr Tyr Asn Tyr Ser Ser Pro Ile Ala Gly Ile Asp Lys
325 330 335

Pro Asn Gly Ala Asn Ile Ser Ser Gln Ile Ile Gly Val Asp Thr Ala
340 345 350

Ser Gly Gln Asn Thr Tyr Lys Gln Thr Val Phe Val Asn Pro Lys Gln
355 360 365

Arg Val Leu Gly Asn Thr Trp Val Tyr Ile Lys Gly Tyr Gln Asp Lys
370 375 380

Ile Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Ser Ala Thr Asp Thr Lys Leu Arg
385 390 395 400

Ile Phe Glu Val Asn Asp Thr Ser Lys Leu Ser Asp Ser Tyr Tyr Ala
405 410 415

Asp Pro Asn Asp Ser Asn Leu Lys Glu Val Thr Asp Gln Phe Lys Asn
420 425 430

Arg Ile Tyr Tyr Glu His Pro Asn Val Ala Ser Ile Lys Phe Gly Asp
435 440 445

Ile Thr Lys Thr Tyr Val Val Leu Val Glu Gly His Tyr Asp Asn Thr
450 455 460

Gly Lys Asn Leu Lys Thr Gln Val Ile Gln Glu Asn Val Asp Pro Val
465 470 475 480

Thr Asn Arg Asp Tyr Ser Ile Phe Gly Trp Asn Asn Glu Asn Val Val
485 490 495

Arg Tyr Gly Gly Gly Ser Ala Asp Gly Asp Ser Ala Val Asn

500 505 510

<210> 118
<211> 1533
<212> DNA
<213> Staphylococcus aureus

<400> 118
atggctagca tgactggtgg acagcaaatg ggtgcttcag aacaatcgaa cgatacaacg 60

caatcttcga aaaataatgc aagtgcagat tccgaaaaaa acaatatgat agaaacacct 120

caattaaata caacggctaa tgatacatct gatattagtg caaacacaaa cagtgcgaat 180

gtagatagca caacaaaacc aatgtctaca caaacgagca ataccactac aacagagcca 240

gcttcaacaa atgaaacacc tcaaccgacg gcaattaaaa atcaagcaac tgctgcaaaa 300

atgcaagatc aaactgttcc tcaagaagca aattctcaag tagataataa aacaacgaat 360

gatgctaata gcatagcaac aaacagtgag cttaaaaatt ctcaaacatt agatttacca 420

caatcatcac cacaaacgat ttccaatgcg caaggaacta gtaaaccaag tgttagaacg 480

agagctgtac gtagtttagc tgttgctgaa ccggtagtaa atgctgctga tgctaaaggt 540

acaaatgtaa atgataaagt tacggcaagt aatttcaagt tagaaaagac tacatttgac 600

cctaatcaaa gtggtaacac atttatggcg gcaaatttta cagtgacaga taaagtgaaa 660

tcaggggatt attttacagc gaagttacca gatagtttaa ctggtaatgg agacgtggat 720

tattctaatt caaataatac gatgccaatt gcagacatta aaagtacgaa tggcgatgtt 780

gtagctaaag caacatatga tatcttgact aagacgtata catttgtctt tacagattat 840

gtaaataata aagaaaatat taacggacaa ttttcattac ctttatttac agaccgagca 900

aaggcaccta aatcaggaac atatgatgcg aatattaata ttgcggatga aatgtttaat 960

aataaaatta cttataacta tagttcgcca attgcaggaa ttgataaacc aaatggcgcg 1020

aacatttctt ctcaaattat tggtgtagat acagcttcag gtcaaaacac atacaagcaa 1080

acagtatttg ttaaccctaa gcaacgagtt ttaggtaata cgtgggtgta tattaaaggc 1140

taccaagata aaatcgaaga aagtagcggt aaagtaagtg ctacagatac aaaactgaga 1200

atttttgaag tgaatgatac atctaaatta tcagatagct actatgcaga tccaaatgac 1260

tctaacctta aagaagtaac agaccaattt aaaaatagaa tctattatga gcatccaaat 1320

gtagctagta ttaaatttgg tgatattact aaaacatatg tagtattagt agaagggcat 1380

tacgacaata caggtaagaa cttaaaaact caggttattc aagaaaatgt tgatcctgta 1440

acaaatagag actacagtat tttcggttgg aataatgaga atgttgtacg ttatggtggt 1500

ggaagtgctg atggtgattc agcagtaaat taa 1533

<210> 119

<211> 292
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 119
Met Gly Thr Gly Gly Lys Gln Ser Ser Asp Lys Ser Asn Gly Lys Leu
1 5 10 15

Lys Val Val Thr Thr Asn Ser Ile Leu Tyr Asp Met Ala Lys Asn Val
20 25 30

Gly Gly Asp Asn Val Asp Ile His Ser Ile Val Pro Val Gly Gln Asp
35 40 45

Pro His Glu Tyr Glu Val Lys Pro Lys Asp Ile Lys Lys Leu Thr Asp
50 55 60

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

Trp Phe Glu Lys Ala Leu Glu Gln Ala Gly Lys Ser Leu Lys Asp Lys
85 90 95

Lys Val Ile Ala Val Ser Lys Asp Val Lys Pro Ile Tyr Leu Asn Gly
100 105 110

Glu Glu Gly Asn Lys Asp Lys Gln Asp Pro His Ala Trp Leu Ser Leu
115 120 125

Asp Asn Gly Ile Lys Tyr Val Lys Thr Ile Gln Gln Thr Phe Ile Asp
130 135 140

Asn Asp Lys Lys His Lys Ala Asp Tyr Glu Lys Gln Gly Asn Lys Tyr
145 150 155 160

Ile Ala Gln Leu Glu Lys Leu Asn Asn Asp Ser Lys Asp Lys Phe Asn
165 170 175

Asp Ile Pro Lys Glu Gln Arg Ala Met Ile Thr Ser Glu Gly Ala Phe
180 185 190

Lys Tyr Phe Ser Lys Gln Tyr Gly Ile Thr Pro Gly Tyr Ile Trp Glu
195 200 205

Ile Asn Thr Glu Lys Gln Gly Thr Pro Glu Gln Met Arg Gln Ala Ile
210 215 220

Glu Phe Val Lys Lys His Lys Leu Lys His Leu Leu Val Glu Thr Ser
225 230 235 240

Val Asp Lys Lys Ala Met Glu Ser Leu Ser Glu Glu Thr Lys Lys Asp
245 250 255

Ile Phe Gly Glu Val Tyr Thr Asp Ser Ile Gly Lys Glu Gly Thr Lys
260 265 270

Gly Asp Ser Tyr Tyr Lys Met Met Lys Ser Asn Ile Glu Thr Val His
275 280 285

Gly Ser Met Lys
290

<210> 120
<211> 879
<212> DNA
<213> Staphylococcus aureus

<400> 120
atgggtactg gtggtaaaca aagcagtgat aagtcaaatg gcaaattaaa agtagtaacg 60

acgaattcaa ttttatatga tatggctaaa aatgttggtg gagacaacgt cgatattcat 120

agtattgtac ctgttggtca agatcctcat gaatatgaag ttaaacctaa agatattaaa 180

aagttaactg acgctgacgt tattttatac aacggattaa atttagagac tggtaacggt 240

tggtttgaaa aagccttaga acaggctggt aaatcattaa aagataaaaa agttatcgca 300

gtatcaaaag atgttaaacc tatctattta aacggtgaag aaggcaacaa agataaacaa 360

gatccacacg catggttaag tttagataat ggtattaaat acgtaaaaac aattcaacaa 420

acatttatcg ataacgacaa aaaacataaa gcagattatg aaaagcaagg taacaaatac 480

attgctcaat tggaaaaatt aaataatgac agtaaagaca aatttaatga cattccaaaa 540

gaacaacgtg ccatgattac aagtgaaggt gccttcaagt acttctcaaa acaatacggt 600

attacaccag gttatatttg ggaaattaac actgaaaaac aaggtacacc tgaacaaatg 660

agacaagcta ttgagtttgt taaaaagcac aaattaaaac acttattagt agaaacaagt 720

gttgataaga aagcaatgga aagtttatct gaagaaacga agaaagatat ctttggtgaa 780

gtgtacacag attcaatcgg taaagaaggc actaaaggtg actcttacta caaaatgatg 840

aaatcaaata ttgaaactgt acacggaagc atgaaataa 879

<210> 121
<211> 292
<212> PRT
<213> Staphylococcus epidermidis

<400> 121
Met Gly Asn His Ser Asn His Glu His His Ser His Glu Gly Lys Leu
1 5 10 15

Lys Val Val Thr Thr Asn Ser Ile Leu Tyr Asp Met Val Lys Arg Val
20 25 30

Gly Gly Asn Lys Val Asp Val His Ser Ile Val Pro Val Gly Gln Asp
35 40 45

Pro His Glu Tyr Glu Val Lys Pro Lys Asp Ile Lys Ala Leu Thr Asp
50 55 60

Ala Asp Val Val Phe Tyr Asn Gly Leu Asn Leu Glu Thr Gly Asn Gly
65 70 75 80

Trp Phe Glu Lys Ala Leu Asp Gln Ala Gly Lys Ser Thr Lys Asp Lys
85 90 95

Asn Val Ile Ala Ala Ser Asn Asn Val Lys Pro Ile Tyr Leu Asn Gly
100 105 110

Glu Glu Gly Asn Lys Asn Lys Gln Asp Pro His Ala Trp Leu Ser Leu
115 120 125

Glu Asn Gly Ile Lys Tyr Val Lys Thr Ile Gln Lys Ser Leu Glu His
130 135 140

His Asp Lys Lys Asp Lys Ser Thr Tyr Glu Lys Gln Gly Asn Ala Tyr
145 150 155 160

Ile Ser Lys Leu Glu Glu Leu Asn Lys Asp Ser Lys Asn Lys Phe Asp
165 170 175

Asp Ile Pro Lys Asn Gln Arg Ala Met Met Thr Ser Glu Gly Ala Phe
180 185 190

Lys Tyr Phe Ala Gln Gln Phe Asp Val Lys Pro Gly Tyr Ile Trp Glu
195 200 205

Ile Asn Thr Glu Lys Gln Gly Thr Pro Gly Gln Met Lys Gln Ala Ile
210 215 220

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

Val Asp Lys Lys Ala Met Gln Ser Leu Ser Glu Glu Thr Lys Lys Asp
245 250 255

Ile Tyr Gly Glu Val Phe Thr Asp Ser Ile Gly Lys Glu Gly Thr Lys

260 265 270

Gly Asp Ser Tyr Tyr Lys Met Met Lys Ser Asn Ile Asp Thr Ile His
275 280 285

Gly Ser Met Lys
290

<210> 122
<211> 879
<212> DNA
<213> Staphylococcus epidermidis

<400> 122
atggggaatc acagtaacca tgaacatcac tcacatgaag gaaaattaaa agttgtaact 60

acaaactcta ttctctatga catggttaaa cgtgtcggtg gaaataaggt cgatgttcat 120

agcatcgttc cagtaggaca agatccacat gaatatgagg ttaaacctaa agatattaaa 180

gcattaacag atgctgacgt tgtattttat aatggtttaa acctagaaac tggaaatggt 240

tggtttgaaa aagcacttga ccaagcagga aaatcaacaa aagataaaaa tgtgatagca 300

gcatcaaata atgttaaacc aatatactta aatggtgagg aaggtaacaa aaacaaacaa 360

gatccacatg catggttaag tttagagaat ggaattaaat acgtaaaaac aatacaaaaa 420

tcactagaac atcatgataa aaaagataag tctacatatg aaaaacaagg gaatgcatat 480

atatcaaaat tagaagaact taataaagat agtaaaaata aatttgatga catacccaaa 540

aatcaacgtg ccatgatgac aagtgaaggt gcatttaaat attttgctca acaattcgat 600

gttaaaccag gttatatttg ggagataaac acagaaaaac aaggtacacc tggtcaaatg 660

aaacaagcca ttaaatttgt taaagataat catttaaaac atttattagt cgaaacaagc 720

gtagataaaa aagctatgca aagtttatca gaagaaacta agaaagatat ttatggtgaa 780

gtatttaccg actctatagg taaggaaggt actaaaggtg actcatacta taaaatgatg 840

aaatctaata ttgatacaat acatggtagt atgaaataa 879

<210> 123
<211> 531
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 123
Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Ser Glu Asn Ser Val
1 5 10 15

Thr Gln Ser Asp Ser Ala Ser Asn Glu Ser Lys Ser Asn Asp Ser Ser
20 25 30

Ser Val Ser Ala Ala Pro Lys Thr Asp Asp Thr Asn Val Ser Asp Thr

```
        35                  40                  45

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

Pro Ala Gln Gln Glu Thr Thr Gln Ser Ser Ser Thr Asn Ala Thr Thr
65                  70                  75                  80

Glu Glu Thr Pro Val Thr Gly Glu Ala Thr Thr Thr Thr Thr Asn Gln
                85                  90                  95

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

Leu Val Asn Gln Thr Ser Asn Glu Thr Thr Phe Asn Asp Thr Asn Thr
        115                 120                 125

Val Ser Ser Val Asn Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val
    130                 135                 140

Ser Thr Thr Gln Asp Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu
145                 150                 155                 160

Ser Ala Pro Gln Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln
                165                 170                 175

Ala Val Asn Thr Ser Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala
            180                 185                 190

Val Ala Ala Asp Ala Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu
        195                 200                 205

Thr Asn Val Thr Val Gly Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His
    210                 215                 220

Gln Ala Gly Tyr Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser
225                 230                 235                 240

Ala Val Lys Gly Asp Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn
                245                 250                 255

Leu Asn Gly Val Thr Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly
            260                 265                 270

Asp Gln Val Leu Ala Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile
        275                 280                 285
```

Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Val Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr
290 295 300

Leu Thr Met Pro Ala Ala Ile Asp Pro Glu Asn Val Lys Lys Thr Gly
305 310 315 320

Asn Val Thr Leu Ala Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys Thr
325 330 335

Val Leu Val Asp Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr Asn Leu Ser Ile
340 345 350

Lys Gly Thr Ile Asp Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln
355 360 365

Thr Ile Tyr Val Asn Pro Ser Gly Asp Asn Val Ile Ala Pro Val Leu
370 375 380

Thr Gly Asn Leu Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln
385 390 395 400

Gln Asn Thr Ser Ile Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp Leu
405 410 415

Ser Glu Ser Tyr Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn
420 425 430

Ser Val Asn Ile Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe
435 440 445

Asn Thr Pro Asp Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn
450 455 460

Gly His Ile Asp Pro Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr
465 470 475 480

Leu Tyr Gly Tyr Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp
485 490 495

Asn Glu Val Ala Phe Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp
500 505 510

Lys Pro Val Val Pro Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro
515 520 525

Ile Pro Glu
530

<210> 124
<211> 1596
<212> DNA
<213> Staphylococcus aureus

<400> 124
atggctagca tgactggtgg acagcaaatg ggtagtgaaa atagtgttac gcaatctgat 60
agcgcaagta acgaaagcaa aagtaatgat tcaagtagcg ttagtgctgc acctaaaaca 120
gacgacacaa acgtgagtga tactaaaaca tcgtcaaaca ctaataatgg cgaaacgagt 180
gtggcgcaaa atccagcaca acaggaaacg acacaatcat catcaacaaa tgcaactacg 240
gaagaaacgc cggtaactgg tgaagctact actacgacaa cgaatcaagc taatacaccg 300
gcaacaactc aatcaagcaa tacaaatgct gaagaattag tgaatcaaac aagtaatgaa 360
acgactttta atgatactaa tacagtatca tctgtaaatt cacctcaaaa ttctacaaat 420
gcggaaaatg tttcaacaac gcaagatact tcaactgaag caacaccttc aaacaatgaa 480
tcagctccac agagtacaga tgcaagtaat aaagatgtag ttaatcaagc ggttaataca 540
agtgcgccta gaatgagagc atttagttta gcggcagtag ctgcagatgc accggcagct 600
ggcacagata ttacgaatca gttgacgaat gtgacagttg gtattgactc tggtacgact 660
gtgtatccac accaagcagg ttatgtcaaa ctgaattatg gtttttcagt gcctaattct 720
gctgttaaag gtgacacatt caaaataact gtacctaaag aattaaactt aaatggtgta 780
acttcaactg ctaaagtgcc accaattatg gctggagatc aagtattggc aaatggtgta 840
atcgatagtg atggtaatgt tatttataca tttacagact atgtaaatac taaagatgat 900
gtaaaagcaa ctttgaccat gcccgctgct attgaccctg aaaatgttaa aaagacaggt 960
aatgtgacat tggctactgg cataggtagt acaacagcaa acaaaacagt attagtagat 1020
tatgaaaaat atggtaagtt ttataactta tctattaaag gtacaattga ccaaatcgat 1080
aaaacaaata atacgtatcg tcagacaatt tatgtcaatc caagtggaga taacgttatt 1140
gcgccggttt taacaggtaa tttaaaacca aatacggata gtaatgcatt aatagatcag 1200
caaaatacaa gtattaaagt atataaagta gataatgcag ctgatttatc tgaaagttac 1260
tttgtgaatc cagaaaactt tgaggatgtc actaatagtg tgaatattac attcccaaat 1320
ccaaatcaat ataaagtaga gtttaatacg cctgatgatc aaattacaac accgtatata 1380
gtagttgtta atggtcatat tgatccgaat agcaaaggtg atttagcttt acgttcaact 1440
ttatatgggt ataactcgaa tataatttgg cgctctatgt catgggacaa cgaagtagca 1500
tttaataacg gatcaggttc tggtgacggt atcgataaac cagttgttcc tgaacaacct 1560
gatgagcctg gtgaaattga accaattcca gagtag 1596

<210> 125

<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Any amino acid

<400> 125
Leu Pro Xaa Thr Gly
1 5

<210> 126
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 126
Thr Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Val Asp
1 5

<210> 127
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 127
Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser
1 5 10

<210> 128
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 128
Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Gly Ser
1 5 10

<210> 129
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 129
Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly
1 5 10

<210> 130
<211> 933
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 130
Met Asn Met Lys Lys Lys Glu Lys His Ala Ile Arg Lys Lys Ser Ile
1 5 10 15

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 Phe 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

Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr
195 200 205

Ser Ala 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 Asn Val Thr
225 230 235 240

Val Gly 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

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 Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Met Pro
325 330 335

Ala Tyr Ile Asp Pro Glu Asn Val Lys Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu
340 345 350

Ala Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp
355 360 365

Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr 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 Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu
405 410 415

Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser
420 425 430

Ile Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser Tyr
435 440 445

Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile

```
450                 455                 460

Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro 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 Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr
            500                 505                 510

Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala
        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 Asp
    610                 615                 620

Asn Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp
625                 630                 635                 640

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

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

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
785 790 795 800

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

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

Ser Asp Ser Asp Ser Ala Ser Asp Ser Asp Ser Gly Ser Asp Ser Asp
835 840 845

Ser Ser Ser Asp Ser Asp Ser Glu Ser Asp Ser Asn Ser Asp Ser Glu
850 855 860

Ser Gly Ser Asn Asn Asn Val Val Pro Pro Asn Ser Pro Lys Asn Gly
865 870 875 880

Thr Asn Ala Ser Asn Lys Asn Glu Ala Lys Asp Ser Lys Glu Pro Leu
885 890 895

Pro Asp Thr Gly Ser Glu Asp Glu Ala Asn Thr Ser Leu Ile Trp Gly
900 905 910

Leu Leu Ala Ser Ile Gly Ser Leu Leu Leu Phe Arg Arg Lys Lys Glu
915 920 925

Asn Lys Asp Lys Lys
930

<210> 131
<211> 2802
<212> DNA

<213> Staphylococcus aureus

<400> 131

atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60

gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120

gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180

agcgttagtg ctgcacctaa aacagacgac acaaacgtga gtgatactaa aacatcgtca 240

aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300

tcatcatcaa caaatgcaac tacggaagaa acgccggtaa ctggtgaagc tactactacg 360

acaacgaatc aagctaatac accggcaaca actcaatcaa gcaatacaaa tgcggaggaa 420

ttagtgaatc aaacaagtaa tgaaacgact tttaatgata ctaatacagt atcatctgta 480

aattcacctc aaaattctac aaatgcggaa aatgtttcaa caacgcaaga tacttcaact 540

gaagcaacac cttcaaacaa tgaatcagct ccacagagta cagatgcaag taataaagat 600

gtagttaatc aagcggttaa tacaagtgcg cctagaatga gagcatttag tttagcggca 660

gtagctgcag atgcaccggc agctggcaca gatattacga atcagttgac gaatgtgaca 720

gttggtattg actctggtac gactgtgtat ccgcaccaag caggttatgt caaactgaat 780

tatggttttt cagtgcctaa ttctgctgtt aaaggtgaca cattcaaaat aactgtacct 840

aaagaattaa acttaaatgg tgtaacttca actgctaaag tgccaccaat tatggctgga 900

gatcaagtat tggcaaatgg tgtaatcgat agtgatggta atgttattta tacatttaca 960

gactatgtaa atactaaaga tgatgtaaaa gcaactttga ccatgcccgc ttatattgac 1020

cctgaaaatg ttaaaaagac aggtaatgtg acattggcta ctggcatagg tagtacaaca 1080

gcaaacaaaa cagtattagt agattatgaa aaatatggta agttttataa cttatctatt 1140

aaaggtacaa ttgaccaaat cgataaaaca aataatacgt atcgtcagac aatttatgtc 1200

aatccaagtg gagataacgt tattgcgccg gttttaacag gtaatttaaa accaaatacg 1260

gatagtaatg cattaataga tcagcaaaat acaagtatta aagtatataa agtagataat 1320

gcagctgatt tatctgaaag ttactttgtg aatccagaaa actttgagga tgtcactaat 1380

agtgtgaata ttacattccc aaatccaaat caatataaag tagagtttaa tacgcctgat 1440

gatcaaatta caacaccgta tatagtagtt gttaatggtc atattgatcc gaatagcaaa 1500

ggtgatttag ctttacgttc aactttatat gggtataact cgaatataat ttggcgctct 1560

atgtcatggg acaacgaagt agcatttaat aacggatcag gttctggtga cggtatcgat 1620

aaaccagttg ttcctgaaca acctgatgag cctggtgaaa ttgaaccaat tccagaggat 1680

tcagattctg acccaggttc agattctggc agcgattcta attcagatag cggttcagat 1740

tcgggtagtg attctacatc agatagtggt tcagattcag cgagtgattc agattcagca 1800

agtgattcag actcagcgag tgattcagat tcagcaagcg attccgactc agcgagcgat 1860

tccgactcag acaatgactc ggattcagat agcgattctg actcagacag tgactcagat 1920

tccgacagtg actcagattc agatagcgat tctgactcag acagtgactc agattcagat 1980

agcgattcag attcagatag cgattcagat tccgacagtg attccgactc agacagcgat 2040

tctgactccg acagtgattc cgactcagac agcgattcag attccgacag tgattccgac 2100

tcagatagcg attccgactc agatagcgac tcagattcag acagcgattc agattcagac 2160

agcgattcag attcagatag cgattcagat tccgacagtg actcagattc cgacagtgac 2220

tcggattcag atagcgattc agattccgac agtgactcag attccgacag tgactcagac 2280

tcagacagtg attcggattc agcgagtgat tcggattcag atagtgattc cgactccgac 2340

agtgactcgg attcagatag cgactcagac tcggatagcg actcggattc agatagcgat 2400

tcggactcag atagcgattc agaatcagac agcgattcag aatcagacag cgattcagat 2460

tcagacagcg actcagacag tgactcagat tcagatagtg actcggattc agcgagtgat 2520

tcagactcag gtagtgactc cgattcatca agtgattccg actcagaaag tgattcaaat 2580

agcgattccg agtcaggttc taacaataat gtagttccgc ctaattcacc taaaaatggt 2640

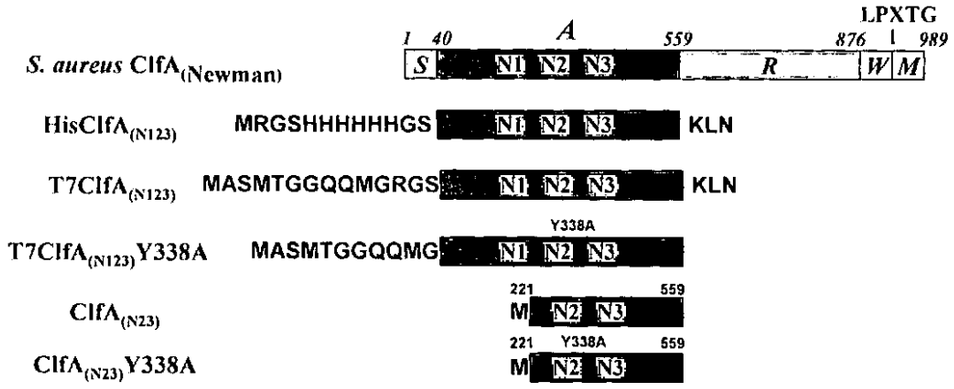
actaatgctt ctaataaaaa tgaggctaaa gatagtaaag aaccattacc agatacaggt 2700

tctgaagatg aagcaaatac gtcactaatt tggggattat tagcatcaat aggttcatta 2760

ctacttttca gaagaaaaaa agaaaataaa gataagaaat aa 2802

325

FIGURE 1


LPXTG
1 40 A 559 876 989
S. aureus ClfA(Newman)
S N1 N2 N3 R W M
HisClfA(N123)
MRGSHHHHHHGS
N1 N2 N3
KLN
T7ClfA(N123)
MASMTGGQQMGRGS
N1 N2 N3
KLN
Y338A
T7ClfA(N123)Y338A
MASMTGGQQMG
N1 N2 N3
221 559
ClfA(N23)
M N2 N3
221 Y338A 559
ClfA(N23)Y338A
M N2 N3

326

FIGURE 2

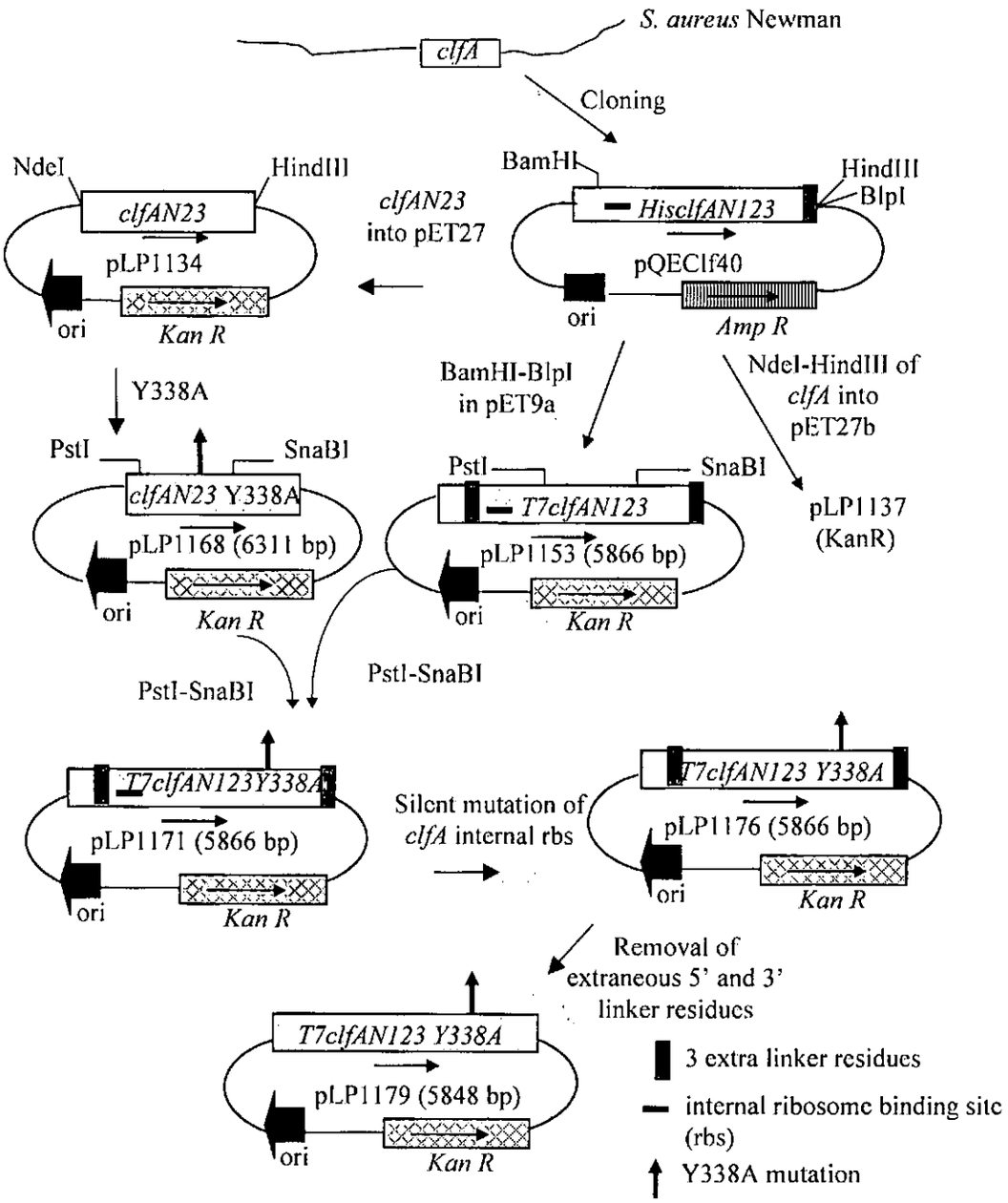

S. aureus Newman
clfA
Cloning
NdeI
HindIII
clfAN23
pLP1134
ori
Kan R
clfAN23 into pET27
BamHI
HindIII
BlpI
HisclfAN123
pQECIf40
ori
Amp R
Y338A
BamHI-BlpI in pET9a
NdeI-HindIII of clfA into pET27b
PstI
SnaBI
clfAN23 Y338A
pLP1168 (6311 bp)
ori
Kan R
PstI
SnaBI
T7clfAN123
pLP1153 (5866 bp)
ori
Kan R
pLP1137 (KanR)
PstI-SnaBI
PstI-SnaBI
T7clfAN123Y338A
pLP1171 (5866 bp)
ori
Kan R
Silent mutation of clfA internal rbs
T7clfAN123 Y338A
pLP1176 (5866 bp)
ori
Kan R
Removal of extraneous 5' and 3' linker residues
T7clfAN123 Y338A
pLP1179 (5848 bp)
ori
Kan R
3 extra linker residues
internal ribosome binding site (rbs)
Y338A mutation

FIGURE 3

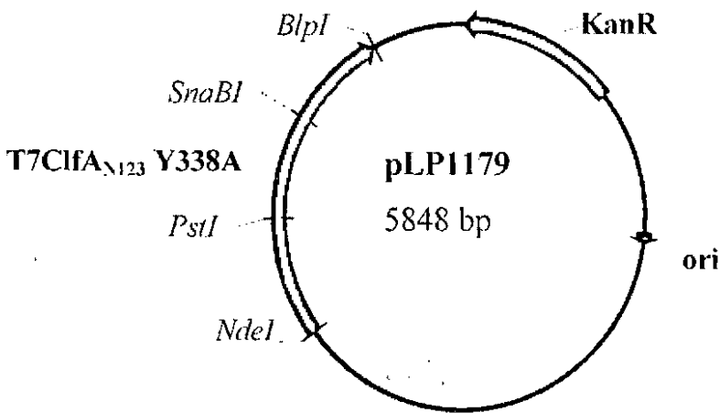
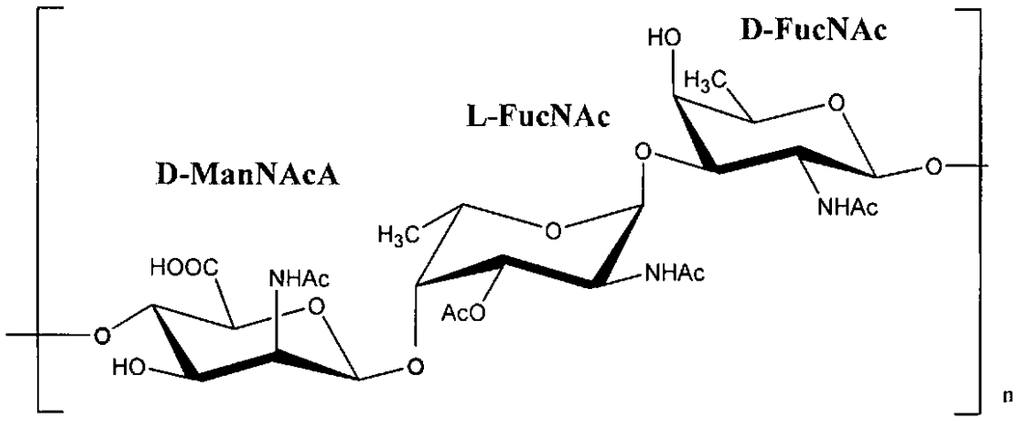
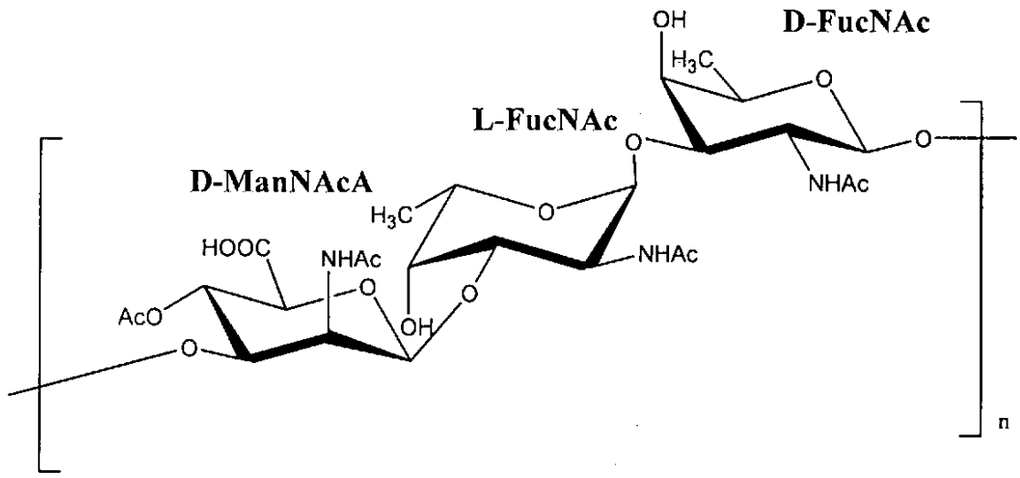

BlpI
KanR
SnaBI
T7ClfA$_{N123}$ Y338A
pLP1179
5848 bp
PstI
ori
NdeI

FIGURE 4



Type 5 CP

[-4)-β-D-ManNAcA-(1-4)-α-L-FucNAc(3-O-Ac)-(1-3)-β-D-FucNAc-(1-]$_n$

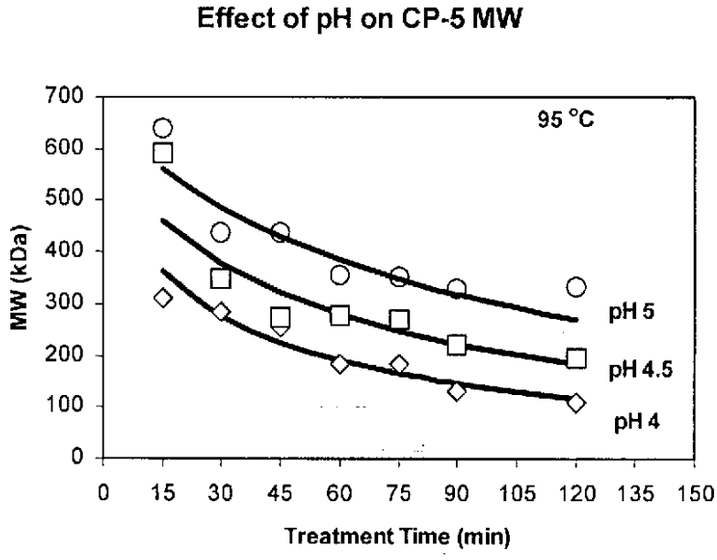


Type 8 CP

[-3)-β-D-ManNAcA(4-O-Ac)-(1-3)-α-L-FucNAc-(1-3)-α-D-FucNAc-(1-]$_n$

FIGURE 5

A.


Effect of pH on CP-5 MW
95 °C
MW (kDa)
700
600
500
400
300
200
100
0
0 15 30 45 60 75 90 105 120 135 150
Treatment Time (min)
pH 5
pH 4.5
pH 4

B.

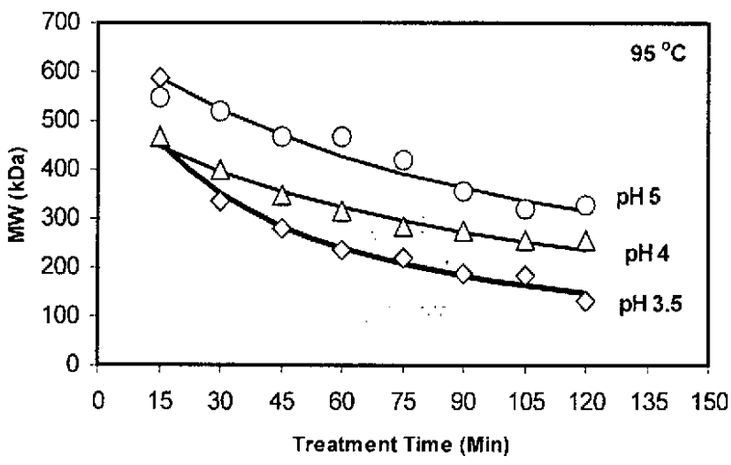
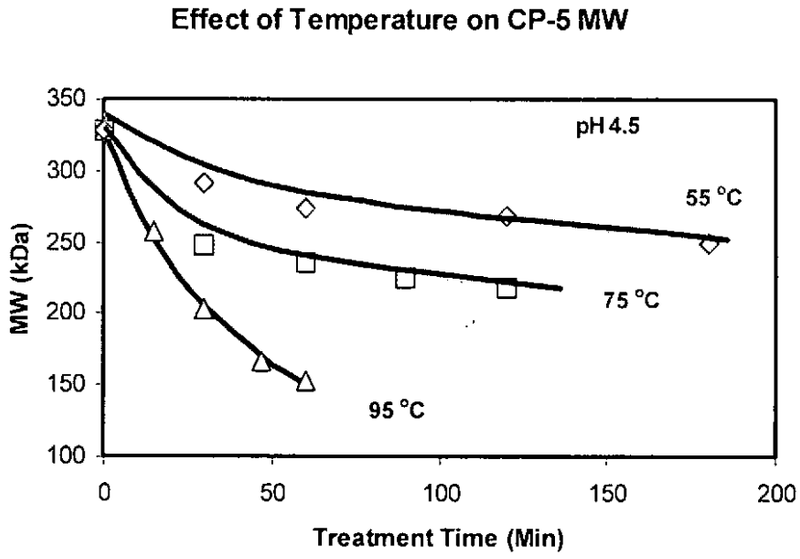

Effect of pH on CP-8 MW
95 °C
MW (kDa)
700
600
500
400
300
200
100
0
0 15 30 45 60 75 90 105 120 135 150
Treatment Time (Min)
pH 5
pH 4
pH 3.5

FIGURE 6

A.


Effect of Temperature on CP-5 MW
pH 4.5
55 °C
75 °C
95 °C
MW (kDa)
350
300
250
200
150
100
0
50
100
150
200
Treatment Time (Min)

B.

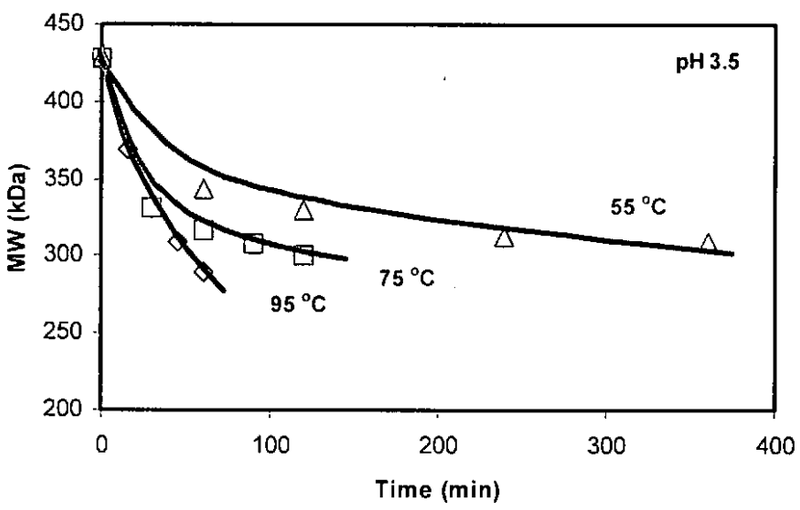

Effect of Temperature on CP-8 MW
pH 3.5
55 °C
75 °C
95 °C
MW (kDa)
450
400
350
300
250
200
0
100
200
300
400
Time (min)

FIGURE 7

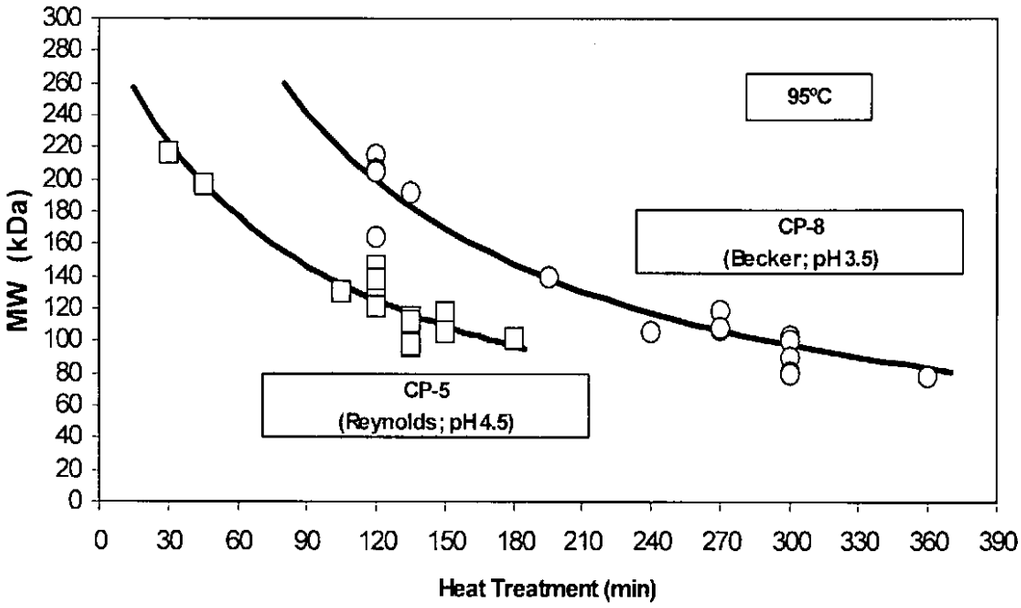

MW (kDa)
300
280
260
240
220
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
30
60
90
120
150
180
210
240
270
300
330
360
390
Heat Treatment (min)
95°C
CP-8
(Becker; pH 3.5)
CP-5
(Reynolds; pH 4.5)

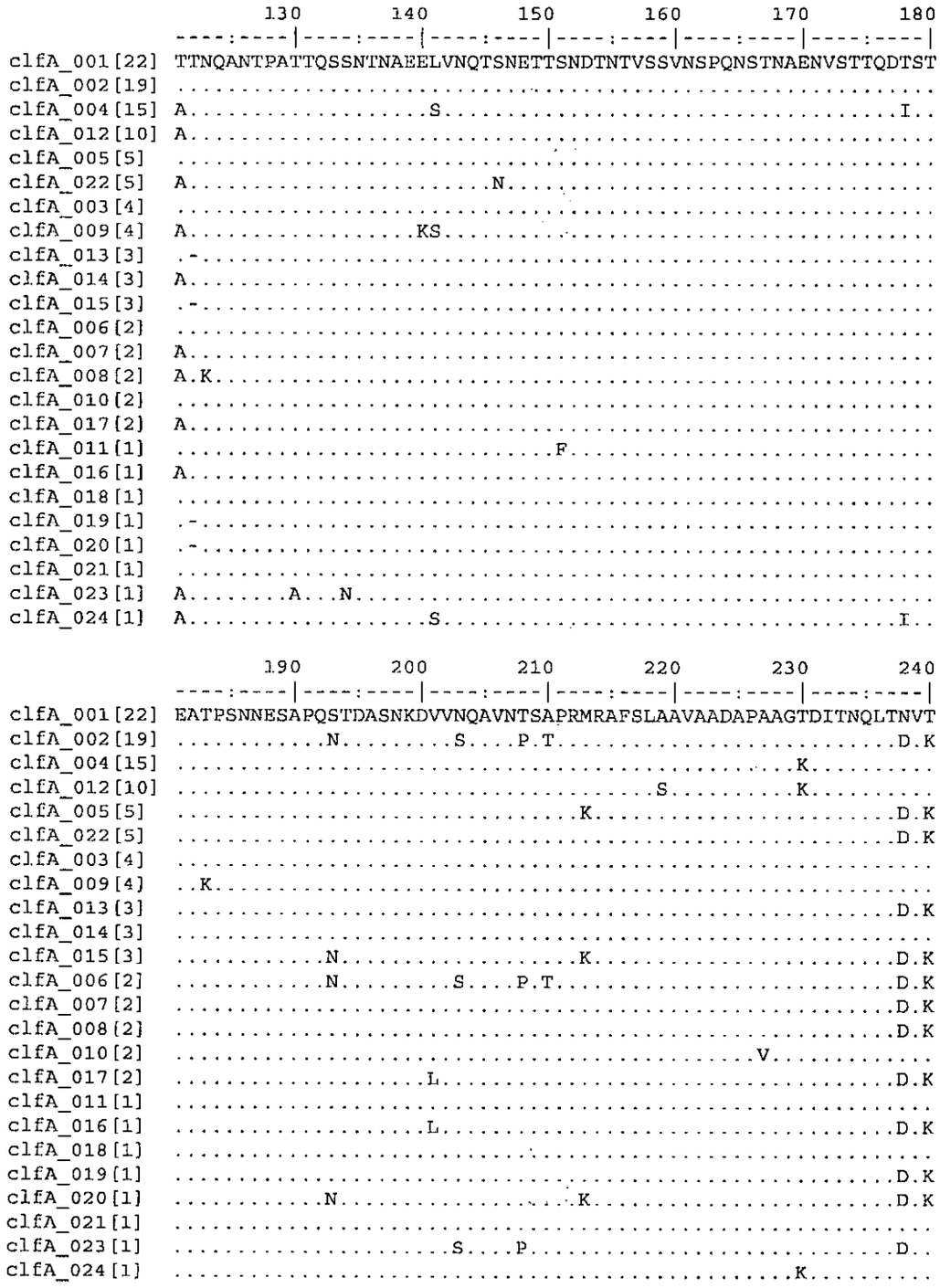
FIGURE 8A ClfA align 1/5

```
                    10        20        30        40        50        60
                    |---:----|---:----|---:----|---:----|---:----|---:----|
clfA_001[22] MNMKKKEKHAIRKKSIGVASVLVGTLIGFGLLSSKEADASENSVTQSDSASNESKSNDSS
clfA_002[19] ..........................................................
clfA_004[15] .....Q.....................................M..TENT.....P.
clfA_012[10] ..........................................................
clfA_005[5]  ..........................................................
clfA_022[5]  ..........................................................
clfA_003[4]  ..........................................................
clfA_009[4]  .....Q.....................................TENT.........
clfA_013[3]  ..........................................................
clfA_014[3]  ..........................................................
clfA_015[3]  ..........................................................
clfA_006[2]  ..........................................................
clfA_007[2]  ..........................................................
clfA_008[2]  ..........................................................
clfA_010[2]  ..........................................................
clfA_017[2]  ..........................................................P.
clfA_011[1]  ..........................................................
clfA_016[1]  ..........................................................
clfA_018[1]  ..........................................................
clfA_019[1]  ..........................................................
clfA_020[1]  ..........................................................
clfA_021[1]  ..........................................................
clfA_023[1]  ..........................................................NP.
clfA_024[1]  .....Q.....................................M..TENT.....P.

                    70        80        90        100       110       120
                    |---:----|---:----|---:----|---:----|---:----|---:----|
clfA_001[22] SVSAAPKTDDTNVSDTKTSSNTNNGETSVAQNPAQQETTQSSSTNATTEETPVTGEATTT
clfA_002[19] ..........................................................
clfA_004[15] ..N......N.....SN.TT...SD..N.............A..............V...
clfA_012[10] ..........................................AL..............-
clfA_005[5]  .IN......N.......PT.......................A...............
clfA_022[5]  .........V.........T....S.................A..........A.......
clfA_003[4]  ..........................................................
clfA_009[4]  ..N......N.....SN.TT...SD..N.............A..............V...
clfA_013[3]  ..........................................AL.........L......A
clfA_014[3]  ..N......N........T.............YL........V..............-
clfA_015[3]  ..........................................AL..............A
clfA_006[2]  ..........................................................
clfA_007[2]  .IN......N........T.......................A..............T...
clfA_008[2]  ..N......N........T....................I..A...............
clfA_010[2]  ..........................................................
clfA_017[2]  ..N......N.....................................L..........-
clfA_011[1]  ..........................................................
clfA_016[1]  ..........................................L..............-
clfA_018[1]  ..................................L.......................
clfA_019[1]  ..........................................AL.........L......A
clfA_020[1]  ..........................................AL..............A
clfA_021[1]  ..........................................................
clfA_023[1]  ..N......N........T.....S.................A..............G...
clfA_024[1]  ..N......N.....SN.TT...SD..N.............A..............V...
```

333

FIGURE 8B ClfA align 2/5



334

FIGURE 8C ClfA align 3/5

```
                 250        260        270        280        290        300
                 ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
clfA_001[22] VGIDSGTTVYPHQAGYVKLNYGFSVPNSAVKGDTFKITVPKELNLNGVTSTAKVPPIMAG
clfA_002[19] .T..........................................................
clfA_004[15] ......D.....................E..Q.........................
clfA_012[10] ......D.....................................................
clfA_005[5]  .T..........................................................
clfA_022[5]  .T..........................................................
clfA_003[4]  ..........................................................
clfA_009[4]  ......D.....................Q.............................
clfA_013[3]  .T..........................................................
clfA_014[3]  ..........................................................
clfA_015[3]  .T..........................................................
clfA_006[2]  .T.........................P................................
clfA_007[2]  .T..........................................................
clfA_008[2]  .T..........................................................
clfA_010[2]  ..........................................................
clfA_017[2]  .T..........................................................
clfA_011[1]  ..........................................................
clfA_016[1]  .T..........................................................
clfA_018[1]  ..........................................................
clfA_019[1]  .T..........................................................
clfA_020[1]  .T.....................................................A....
clfA_021[1]  ......D.....................................................
clfA_023[1]  ...E..D.....................................................
clfA_024[1]  ......D.....................E..Q.............................

                 310        320        330        340        350        360
                 ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
clfA_001[22] DQVLANGVIDSDGNVIYTFTDYVNTKDDVKATLTMPAYIDPENVKKTGNVTLATGIGSTT
clfA_002[19] ......................DN.EN.T.NI...........T.......T....TN.
clfA_004[15] ..........................................T...................
clfA_012[10] ......................D..EN.T.NI...........T.......T.......
clfA_005[5]  ......................DN.EN.T.NI...........T.......T....TN.
clfA_022[5]  ......................DN.EN.T.NI...........T.......T....TN.
clfA_003[4]  ..........................................N...................
clfA_009[4]  ..............................V.......Y.TH...........N..
clfA_013[3]  ......................D..N.....V.........T.......K....TN.
clfA_014[3]  ..........N.....................................T...........
clfA_015[3]  ......................DN.EN.T.NI...........T.......T....TN.
clfA_006[2]  ......................DN.EN.T.NI...........T.......T....TN.
clfA_007[2]  ......................DN.EN.T.NI...........T.......T....TN.
clfA_008[2]  ..........................................T...................
clfA_010[2]  ..........................................................
clfA_017[2]  ......................D..EN.T.NI...........T.......T.......
clfA_011[1]  ..........................................................
clfA_016[1]  ......................DN.N.................T.......T.......
clfA_018[1]  ..........................................T...........N..
clfA_019[1]  ......................DN.N.......V.........T.......T....TN.
clfA_020[1]  ......................DN.EN.T.NI...........T.......T....TN.
clfA_021[1]  ..........................................T...........N..
clfA_023[1]  ..............................V.......Y.TH...........N..
clfA_024[1]  ..........................................T...................
```

335

FIGURE 8D ClfA align 4/5

```
                370        380        390        400        410        420
                ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
clfA_001[22] ANKTVLVDYEKYGKFYNLSIKGTIDQIDKTNNTYRQTIYVNPSGDNVIAPVLTGNLKPNT
clfA_002[19] .S....I......Q.H.............................VL.A.....I...
clfA_004[15] ..............................................................
clfA_012[10] ..............................................................
clfA_005[5]  .S....I......Q.H.............................VL.A.....I...
clfA_022[5]  .S....I......Q.H.............................VL.A.....I...
clfA_003[4]  ..............................................................
clfA_009[4]  ..............................................................
clfA_013[3]  DS....I......Q.H.............................VL.A.....I...
clfA_014[3]  ..............................................................
clfA_015[3]  .S....I......Q.H.............................VL.A.....I...
clfA_006[2]  .S....I......Q.H.............................VL.A.....I...
clfA_007[2]  .S....I......Q.H.............................VL.A.....I...
clfA_008[2]  ..............................................................
clfA_010[2]  ..............................................................
clfA_017[2]  ..............................................................
clfA_011[1]  ..............................................................
clfA_016[1]  ..............................................................
clfA_018[1]  ..............................................................
clfA_019[1]  .S....I......Q.H.............................VL.......I.KS
clfA_020[1]  .S....I......Q.H.............................VL.A.....I...
clfA_021[1]  ..............................................................
clfA_023[1]  ..........................V.....................................
clfA_024[1]  ..............................................................

                430        440        450        460        470        480
                ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
clfA_001[22] DSNALIDQQNTSIKVYKVDNAADLSESYFVNPENFEDVTNSVNITFPNPNQYKVEFNTPD
clfA_002[19] K......AK..D....R....N......Y...SD......Q.R.S...A.......P.D.
clfA_004[15] .......A.............S......Y...D......D.....................
clfA_012[10] ..............................................................
clfA_005[5]  K......AK..D....R....N......Y...SD......Q.R.S...A.......P.D.
clfA_022[5]  K......AK..D....R....N......Y...SD......Q.R.S...A.......P.D.
clfA_003[4]  ..............................................................
clfA_009[4]  E.............................................................
clfA_013[3]  K......AK..D....R....N......Y...SD......Q.R.S...A.......P.D.
clfA_014[3]  ..............................................................P.D.
clfA_015[3]  K......AK..D....R....N......Y...SD......Q.R.S...A.......P.D.
clfA_006[2]  K......AK..D....R....N......Y...SD......Q.R.S...A.......P.D.
clfA_007[2]  K......AK..D....R....N......Y...SD......Q.R.S...A.......P.D.
clfA_008[2]  ..............................................................
clfA_010[2]  ..............................................................
clfA_017[2]  ..............................................................
clfA_011[1]  ..............................................................
clfA_016[1]  ..............................................................
clfA_018[1]  ..............................................................
clfA_019[1]  N......AN..N.........N......Y...SD......Q.R.S...A.......P.D.
clfA_020[1]  K......AK..D....R....N......Y...SD......Q.R.S...A.......P.D.
clfA_021[1]  ..............................................................
clfA_023[1]  ..............................................................
clfA_024[1]  .......A.............S......Y...D......D.....................
```

336

FIGURE 8E ClfA align 5/5

```
                490       500       510       520       530       540
               ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
clfA_001[22] DQITTPYIVVVNGHIDPNSKGDLALRSTLYGYNSNIIWRSMSWDNEVAFNNGSGSGDGID
clfA_002[19] ..................A.T........F...D..F.....................
clfA_004[15] ..............................................................
clfA_012[10] ..................................D.RFV.....................
clfA_005[5]  ..................A.T........F...D..F.....................
clfA_022[5]  ..................A.T........F...D..F.....................
clfA_003[4]  ..............................................................
clfA_009[4]  ..............................................................
clfA_013[3]  ..................A.T........F...D..F.....................
clfA_014[3]  ..............................................................
clfA_015[3]  ..................A.T........F...D..F.....................
clfA_006[2]  ..................A.T........F...D..F.....................
clfA_007[2]  ..................A.T........F...D..F.....................
clfA_008[2]  ..................................D.RFV.....................
clfA_010[2]  ..............................................................
clfA_017[2]  ..............................................................
clfA_011[1]  ..............................................................
clfA_016[1]  ..............................................................
clfA_018[1]  ..............................................................
clfA_019[1]  ..................A.T........F...D..F.....................
clfA_020[1]  ..................A.T........F...D..F.....................
clfA_021[1]  ..................................D.RFV.....................
clfA_023[1]  ..............................................................
clfA_024[1]  ..............................................................F.....

                550       560       570       580       590       600
               ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
clfA_001[22] KPVVPEQPDEPGEIEPIPE
clfA_002[19] ...................
clfA_004[15] ...................
clfA_012[10] ...................
clfA_005[5]  ...................
clfA_022[5]  ...................
clfA_003[4]  ...................
clfA_009[4]  ...................
clfA_013[3]  ...................
clfA_014[3]  ...................
clfA_015[3]  ...................
clfA_006[2]  ...................
clfA_007[2]  ...................
clfA_008[2]  ...................
clfA_010[2]  ...................
clfA_017[2]  ...................
clfA_011[1]  ...................
clfA_016[1]  ...................
clfA_018[1]  ...................
clfA_019[1]  ...................
clfA_020[1]  ...................
clfA_021[1]  ...................
clfA_023[1]  ...................
clfA_024[1]  ...................
```

FIGURE 9
ClfA Phylogenetic Tree

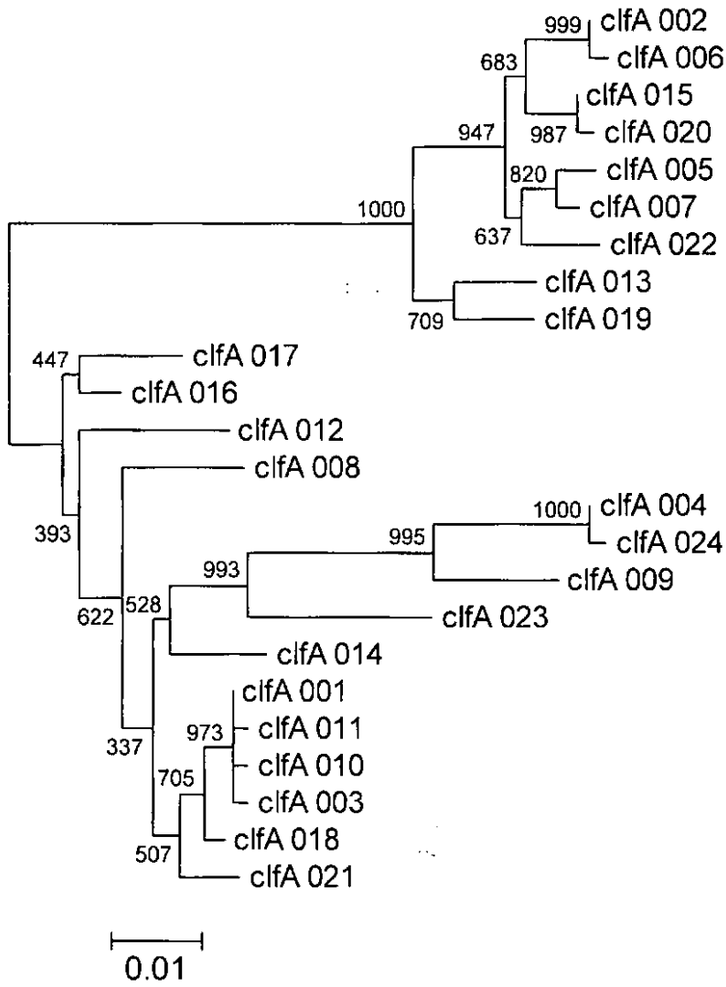
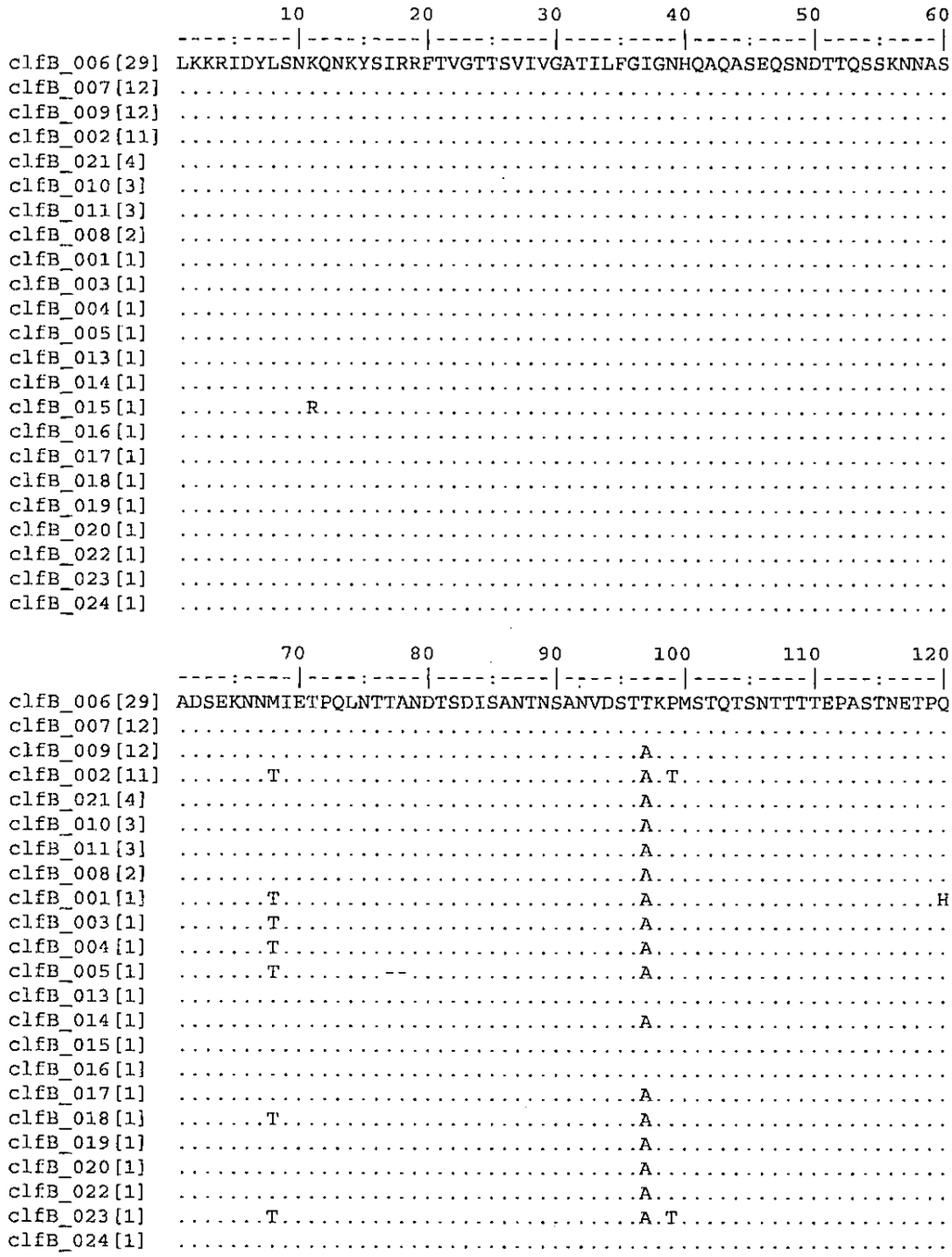


FIGURE 10A ClfB Align 1/5



339

FIGURE 10B ClfB Align 2/5

```
                130       140       150       160       170       180
               ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
clfB_006[29] PTAIKNQATAAKMQDQTVPQEANSQVDNKTTNDANSIATNSELKNSQTLDLPQSSPQTIS
clfB_007[12] ..............................................................
clfB_009[12] L....D.....................................P.....P.............
clfB_002[11] .....D.....................N.....P.....P.....P.....P.....P.....
clfB_021[4]  .....D.....................N.....P.....P.....P.....P.....P.....
clfB_010[3]  L....D.....................P.....P.....P.....P.....P.....P.....
clfB_011[3]  .....D.....................P.....P.....P.....P.....P.....P.....
clfB_008[2]  .....D.....................P.....P.....P.....P.....P.....P.....
clfB_001[1]  .....D.....................P.....P.....P.....P.....P.....P.....
clfB_003[1]  .....D.....................P.S...P.....P.....P.....P.....P.....
clfB_004[1]  .....D.....R.....T.....P.....P.....P.....P.....P.....P.....
clfB_005[1]  .....D.....R.....T.....P.....P.....P.....P.....P.....P.....
clfB_013[1]  .....D.....................P.....P.....P.....P.....P.....P.....
clfB_014[1]  .....D.....................P.....P.....P.....P.....P.....P.....
clfB_015[1]  ..............................................................
clfB_016[1]  .....T.....................T.....T.....T.....T.....T.....T.....
clfB_017[1]  .....D.....C....P.....P.....P.....P.....P.....P.....P.....P.....
clfB_018[1]  .....D.....................P.....P.....P.....P.....P.....P.....
clfB_019[1]  .....D.....................P.....P.....P.....P.....P.....P.....
clfB_020[1]  .....D.....N.....G...P.....P.....P.....P.....P.....P.....P.....
clfB_022[1]  .....D.....................P.....P.....P.....P.....P.....P.....
clfB_023[1]  .....D.....N.....P.....P.....P.....P.....P.....P.....P.....P.....
clfB_024[1]  ..............................................................

                190       200       210       220       230       240
               ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
clfB_006[29] NAQGTSKPSVRTRAVRSLAVAEPVVNAADAKGTNVNDKVTASNFKLEKTTFDPNQSGNTF
clfB_007[12] ..............................................................
clfB_009[12] .....KD.Q.....KD.Q.....KD.Q.....KD.Q.....KD.Q.....KD.Q.....
clfB_002[11] .....D.....A.....D.....A.....D.....A.....D.....A.....D.....A.....
clfB_021[4]  .....D.....D.....D.....D.....D.....D.....D.....D.....D.....
clfB_010[3]  .....KD.Q.....KD.Q.....KD.Q.....KD.Q.....KD.Q.....KD.Q.....
clfB_011[3]  .....LQ.Q.....LQ.Q.....LQ.Q.....LQ.Q.....LQ.Q.....LQ.Q.....
clfB_008[2]  ...R.....GQ....D.....GQ....D.....GQ....D.....GQ....D.....GQ....D.....
clfB_001[1]  .....T.....GQ....D.....GQ....D.....GQ....D.....GQ....D.....GQ....D.....
clfB_003[1]  .....KD.Q.....KD.Q.....KD.Q.....KD.Q.....KD.Q.....KD.Q.....
clfB_004[1]  .....KD.Q.....KD.Q.....KD.Q.....KD.Q.....KD.Q.....KD.Q.....
clfB_005[1]  .....KD.Q.....KD.Q.....KD.Q.....KD.Q.....KD.Q.....KD.Q.....
clfB_013[1]  .....KD.Q.....KD.Q.....KD.Q.....KD.Q.....KD.Q.....KD.Q.....
clfB_014[1]  .....GQ....D.....GQ....D.....GQ....D.....GQ....D.....GQ....D.....
clfB_015[1]  ..............................................................
clfB_016[1]  ..............................................................
clfB_017[1]  .....KD.Q.....KD.Q.....KD.Q.....KD.Q.....KD.Q.....KD.Q.....
clfB_018[1]  ......E.....D.....D.....D.....D.....D.....D.....D.....D.....
clfB_019[1]  ...R.....LQ.Q.....LQ.Q.....LQ.Q.....LQ.Q.....LQ.Q.....LQ.Q.....
clfB_020[1]  .....D.....D.....D.....D.....D.....D.....D.....D.....D.....
clfB_022[1]  .....KD.Q.....KD.Q.....KD.Q.....KD.Q.....KD.Q.....KD.Q.....
clfB_023[1]  .....DL.....A.....DL.....A.....DL.....A.....DL.....A.....DL.....A.....
clfB_024[1]  .....D.....D.....D.....D.....D.....D.....D.....D.....D.....
```

FIGURE 10C ClfB Align 3/5

```
                  250        260        270        280        290        300
                  ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
clfB_006[29] MAANFTVTDKVKSGDYFTAKLPDSLTGNGDVDYSNSNNTMPIADIKSTNGDVVAKATYDI
clfB_007[12] ............................................................
clfB_009[12] .........GQ..............V.....................VNDKNE.........
clfB_002[11] .....K..GQ..............V.....................................
clfB_021[4]  ............................................................T...N.
clfB_010[3]  .........GQ..............V.....................................
clfB_011[3]  ............................................................
clfB_008[2]  ..V..K.AG.......Y.............................................
clfB_001[1]  .....K.AG...............V.....................................
clfB_003[1]  .........GQ..............V.....................VNDKNE.........
clfB_004[1]  .........GQ............E.............................N.........
clfB_005[1]  .........GQ............E.............................N.........
clfB_013[1]  .........GQ..............V.....................................
clfB_014[1]  ...K....GQ..A...........VN.....................................
clfB_015[1]  ............................................................
clfB_016[1]  ............................................................
clfB_017[1]  .........GQ..............V.....................................
clfB_018[1]  .....K.AG...............V.....................VNDKKE.........
clfB_019[1]  ............................................................
clfB_020[1]  ............................................................T...N.
clfB_022[1]  .........GQ..............V.....................................
clfB_023[1]  .....K..GQ..............V.....................................
clfB_024[1]  ............................................................

                  310        320        330        340        350        360
                  ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
clfB_006[29] LTKTYTFVFTDYVNNKENINGQFSLPLFTDRAKAPKSGTYDANINIADEMFNNKITYNYS
clfB_007[12] ............................................................
clfB_009[12] ..............D.Q....K.......................................
clfB_002[11] ..............D.....................................D.........
clfB_021[4]  ..............D.....................................D.........
clfB_010[3]  ..............E.....................................D.........
clfB_011[3]  ..............D.....................................D.........
clfB_008[2]  ..............D.....................................D.........
clfB_001[1]  ..............D.....................................D.........
clfB_003[1]  ..............D.Q....K.............I.....................D.........
clfB_004[1]  ..............D.....................................D.........
clfB_005[1]  ..............D.....................................D.........
clfB_013[1]  ..............E.....................................D.........
clfB_014[1]  ..............D.....................................D.........
clfB_015[1]  ..............D.....................................D.........
clfB_016[1]  ..............D.....................................D.........
clfB_017[1]  ..............D.....................................D.........
clfB_018[1]  ..............D.....................................Q.........
clfB_019[1]  ..............D.....................................D.........
clfB_020[1]  ..............D.....................................D.........
clfB_022[1]  ..............D.....................................D.........
clfB_023[1]  ..............D.....................................D.........
clfB_024[1]  ..............D.....................................D.........
```

341

FIGURE 10D ClfB Align 4/5

```
                370       380       390       400       410       420
                ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
clfB_006[29] SPIAGIDKPNGANISSQIIGVDTASGQNTYKQTVFVNPKQRVLGNTWVYIKGYQDKIEES
clfB_007[12] ....................................................................
clfB_009[12] ....................................................................
clfB_002[11] ....................................................................
clfB_021[4]  ....................................................................
clfB_010[3]  ....................................................................
clfB_011[3]  ....................................................................
clfB_008[2]  ....................................................................
clfB_001[1]  ....................................................................
clfB_003[1]  ....................................................................
clfB_004[1]  ....................................................................
clfB_005[1]  ....................................................................
clfB_013[1]  ....................................................................
clfB_014[1]  ..................................Y.................................
clfB_015[1]  ....................................................................
clfB_016[1]  ....................................................................
clfB_017[1]  ....................................................................
clfB_018[1]  ....................................................................
clfB_019[1]  ....................................................................
clfB_020[1]  ....................................................................
clfB_022[1]  ....................................................................
clfB_023[1]  ....................................................................
clfB_024[1]  ....................................................................

                430       440       450       460       470       480
                ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
clfB_006[29] SGKVSATDTKLRIFEVNDTSKLSDSYYADPNDSNLKEVTDQFKNRIYYEHPNVASIKFGD
clfB_007[12] ................I...................................................
clfB_009[12] ..........................................DK.T.KYQ.....N...
clfB_002[11] ......................................GE..DK.S.KYD.....N...
clfB_021[4]  ......................................NE..DK.T.KYQ.....N...
clfB_010[3]  ......................................NE..DK.T.KYQ.....N...
clfB_011[3]  ..........................................DK.T.KYQ.....N...
clfB_008[2]  ......................................NE..DK.T.KYQ.....N...
clfB_001[1]  ..........................................DK.S.KYD.....N...
clfB_003[1]  ......................................GE.N...F.........N...
clfB_004[1]  ..........................................DK.T.KYQ.....N...
clfB_005[1]  ..........................................DK.T.KYQ.....N...
clfB_013[1]  ......................................NE..DK.T.KYQ.....N...
clfB_014[1]  ......................................NE..DK.T.KYQ.....N...
clfB_015[1]  ....................................................................
clfB_016[1]  ....................................................................
clfB_017[1]  ......................................NE..DK.T.KYQ.....N...
clfB_018[1]  ......................................NE..DK.T.KYQ.....N...
clfB_019[1]  ......K.............................................N...
clfB_020[1]  ......................................NE..DK.T.KYQ.....N...
clfB_022[1]  ......................................NE..DK.T.KYQ.....N...
clfB_023[1]  ......................................GE..DK.S.KYD.....N...
clfB_024[1]  ....................................................................
```

342

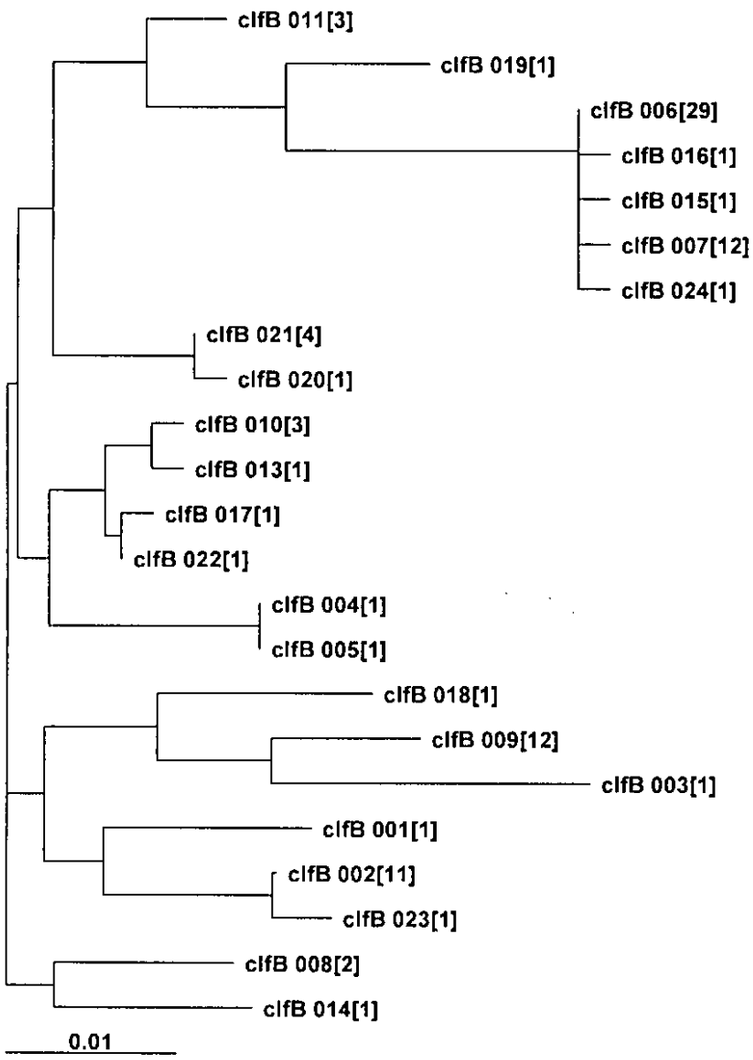
FIGURE 10E ClfB Align 5/5

```
                490       500       510       520       530       540
                ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
clfB_006[29] ITKTYVVLVEGHYDNTGKNLKTQVIQENVDPVTNRDYSIFGWNNENVVRYGGGSADGDSAVN
clfB_007[12] ....................................................................
clfB_009[12] .N..........K.................A.GK.....................................
clfB_002[11] .N.........................I..A.GK.....................................
clfB_021[4]  .........................I..A.GK.....................................
clfB_010[3]  .........................I..A.GK.....................................
clfB_011[3]  .N.......................I..A.GK.....................................
clfB_008[2]  .........................I..A.GK.....................................
clfB_001[1]  .N.......................I..A.GK.....................................
clfB_003[1]  .N.......................I..A.GK.....................................
clfB_004[1]  .........................I..A.GK.....................................
clfB_005[1]  .........................I..A.GK.....................................
clfB_013[1]  .........................I..A.GK.....................................
clfB_014[1]  .........................I..A.GK.....................................
clfB_015[1]  ....................................................................
clfB_016[1]  ....................................................................
clfB_017[1]  .........................I..A.GK.....................................
clfB_018[1]  .N.......................I..A.GK.....................................
clfB_019[1]  .........................I..A.GK.....................................
clfB_020[1]  .........................I..A.GK.....................................
clfB_022[1]  .........................I..A.GK.....................................
clfB_023[1]  .N.......................I.SA.GK.....................................
clfB_024[1]  ....................................................................
```

343

FIGURE 11

ClfB PhylogeneticTree



344

FIGURE 12 MntC Alignment

```
                10        20        30        40        50        60
           ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
305_001[94] MKKLVPLLLALLLLVAACGTGGKQSSDKSNGKLKVVTTNSILYDMAKNVGGDNVDIHSIV
305_006[3]  ............................................................
305_007[3]  ..................D.........................................
305_002[2]  ............................................................
305_003[2]  ............................................................
305_009[1]  ............................................................
305_008[1]  ............................................................

                70        80        90        100       110       120
           ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
305_001[94] PVGQDPHEYEVKPKDIKKLTDADVILYNGLNLETGNGWFEKALEQAGKSLKDKKVIAVSK
305_006[3]  ............................................................
305_007[3]  ............................................................
305_002[2]  ......................I.....................................
305_003[2]  ............................................................
305_009[1]  ............................................................
305_008[1]  ............................................................

                130       140       150       160       170       180
           ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
305_001[94] DVKPIYLNGEEGNKDKQDPHAWLSLDNGIKYVKTIQQTFIDNDKKHKADYEKQGNKYIAQ
305_006[3]  ............................................................
305_007[3]  ............................................................
305_002[2]  ............................................................
305_003[2]  ............................................................
305_009[1]  ............................................................
305_008[1]  ...........................................................Y....

                190       200       210       220       230       240
           ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
305_001[94] LEKLNNDSKD---KFNDIPKEQRAMITSEGAFKYFSKQYGITPGYIWEINTEKQGTPEQM
305_006[3]  ..........---...................................................
305_007[3]  ..........---...................................................
305_002[2]  ..........---...................................................
305_003[2]  ..........SKD...................................................
305_009[1]  ..........---...X...............................................
305_008[1]  ..........---....................................................

                250       260       270       280       290       300
           ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
305_001[94] RQAIEFVKKHKLKHLLVETSVDKKAMESLSEETKKDIFGEVYTDSIGKEGTKGDSYYKMM
305_006[3]  ............................................................
305_007[3]  ............................................................
305_002[2]  ............................................................
305_003[2]  ............................................................
305_009[1]  ............................................................
305_008[1]  ............................................................

          310       320       330       340       350       360
           ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
305_001[94] KSNIETVHGSMK
305_006[3]  ....D.......
305_007[3]  ............
305_002[2]  ............
305_003[2]  ............
305_009[1]  ....D.......
305_008[1]  ....D.......
```

345

FIGURE 13

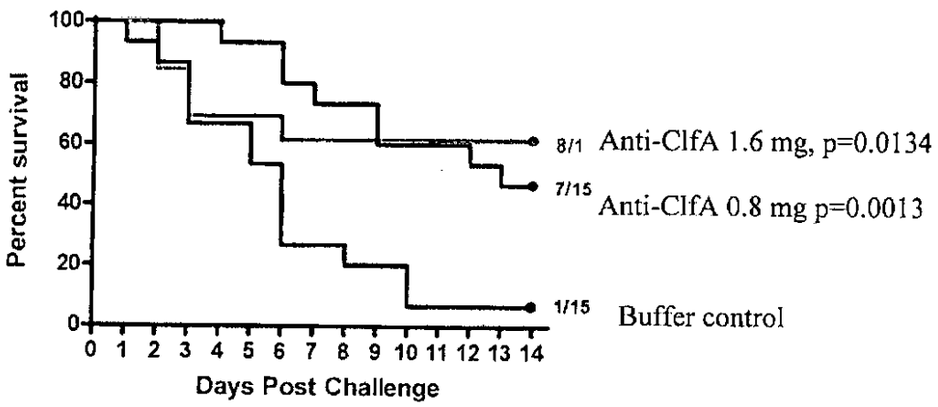
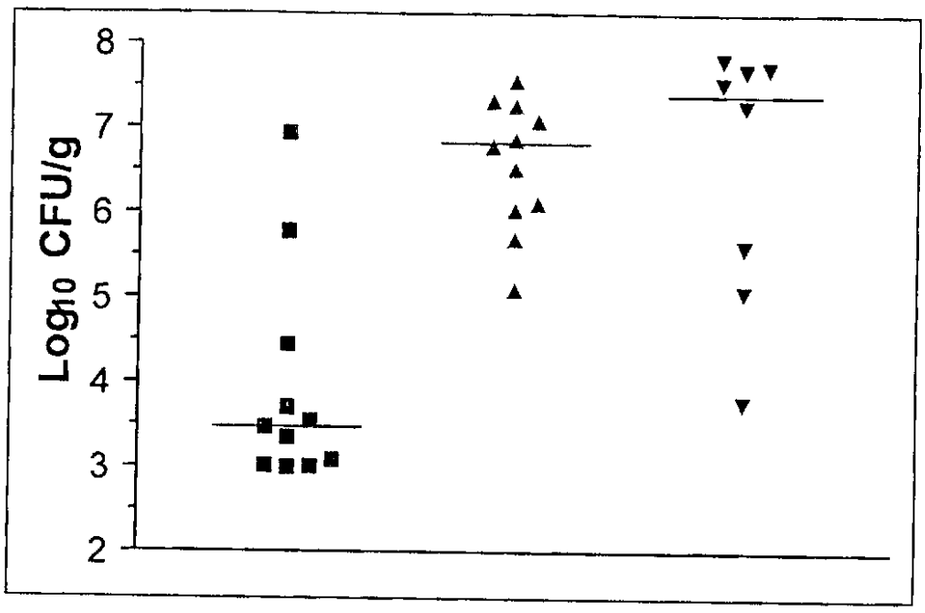
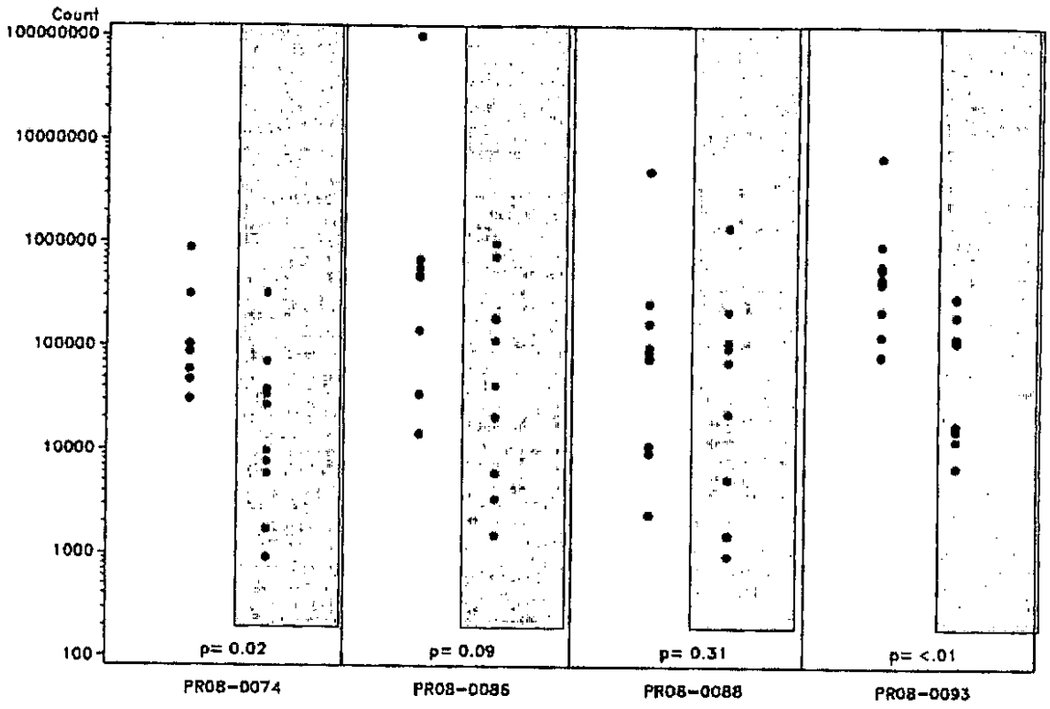


FIGURE 14



347

FIGURE 15A



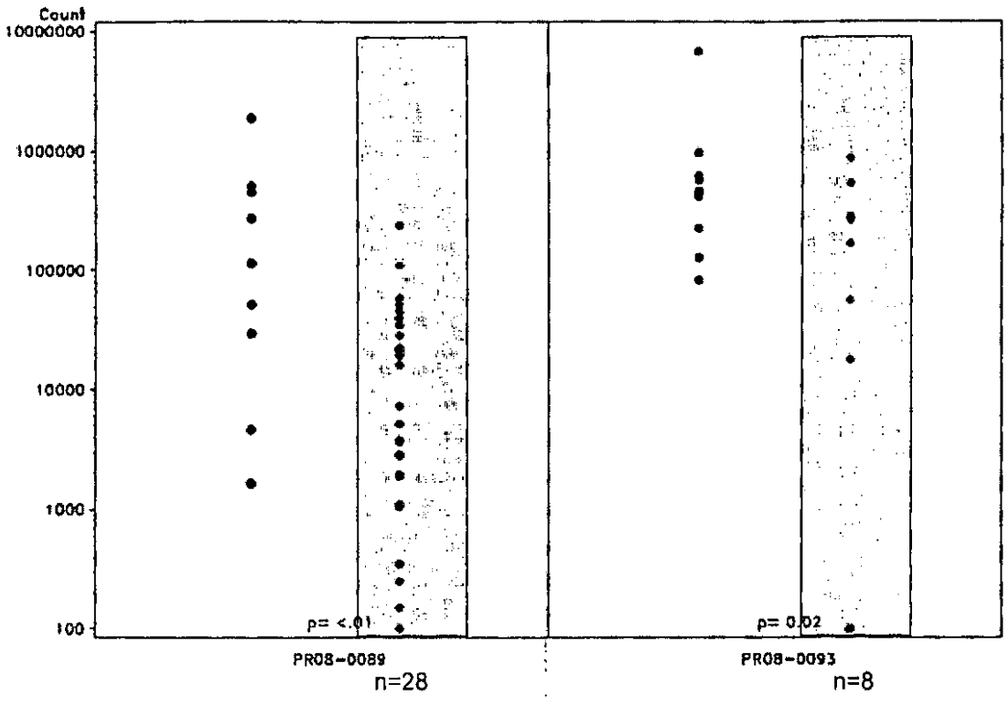
n=10 n=9 n=9 n=8

Meta analysis p= 0.0001

Shaded area is the MntC immunized group.

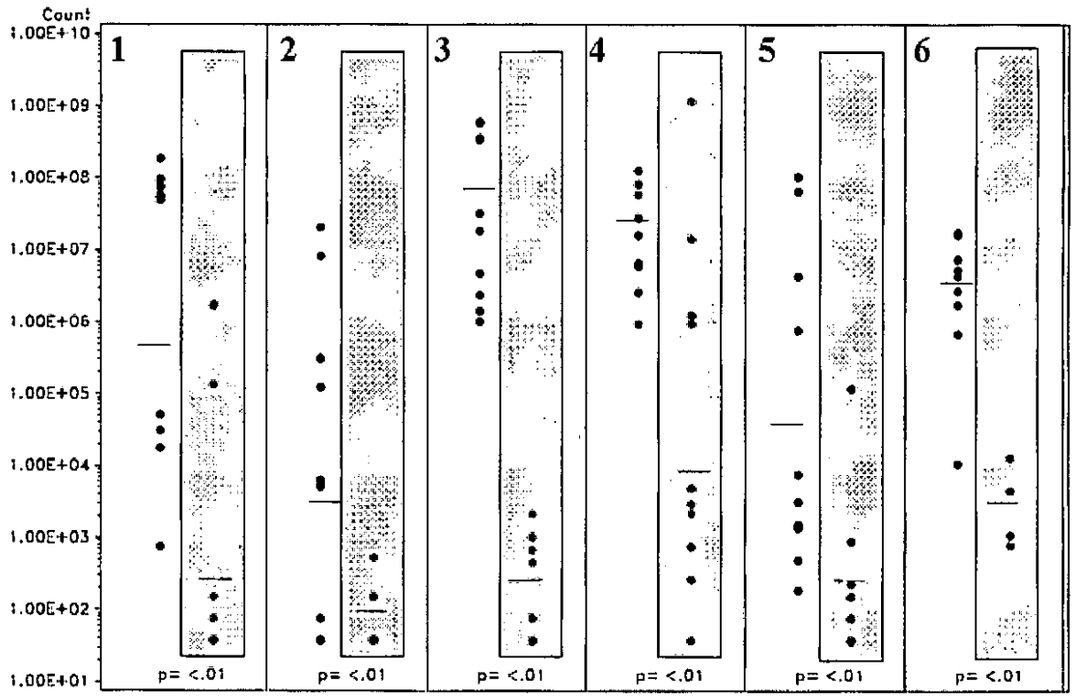
3A8

FIGURE 15B



Meta analysis p= < 0.0001
Shaded area is MntC immunized group

FIGURE 16



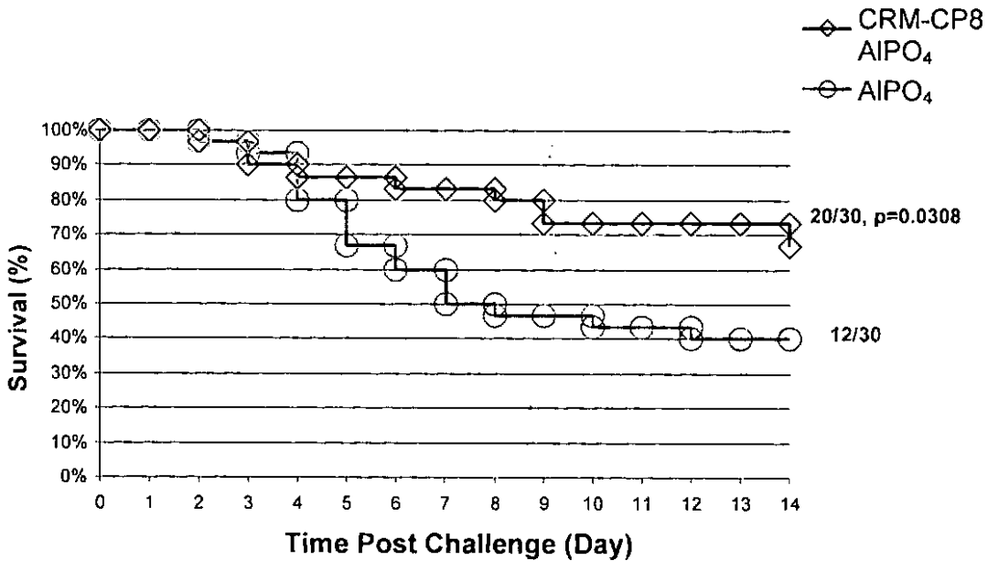
n=10 n=10 n=10 n=10 n=10 n=4

Meta analysis p= < 0.0001

Shaded area is serotype 5 polysaccharide conjugate-immunized group

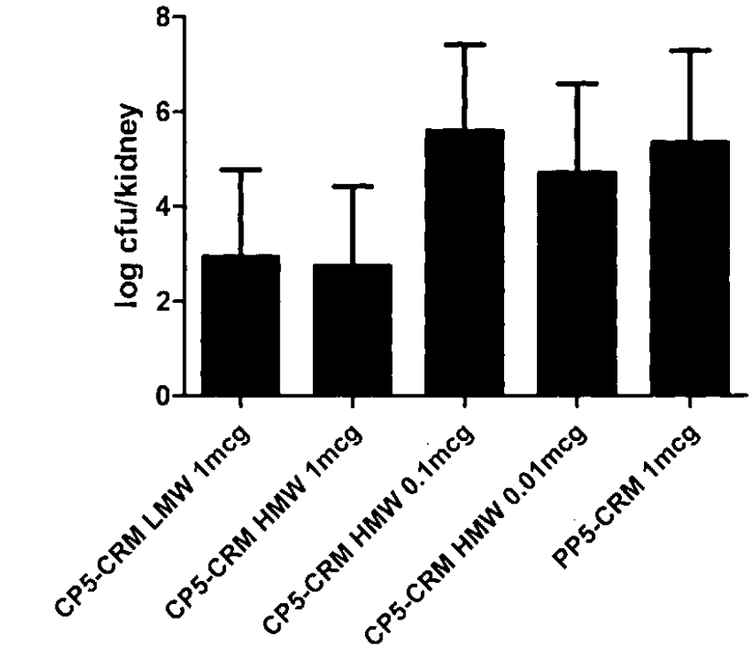
350

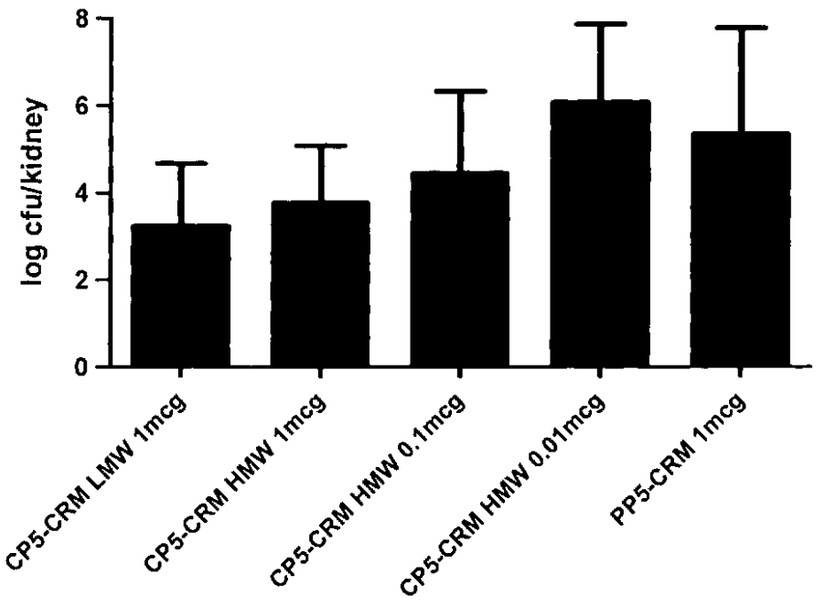
FIGURE 17



351

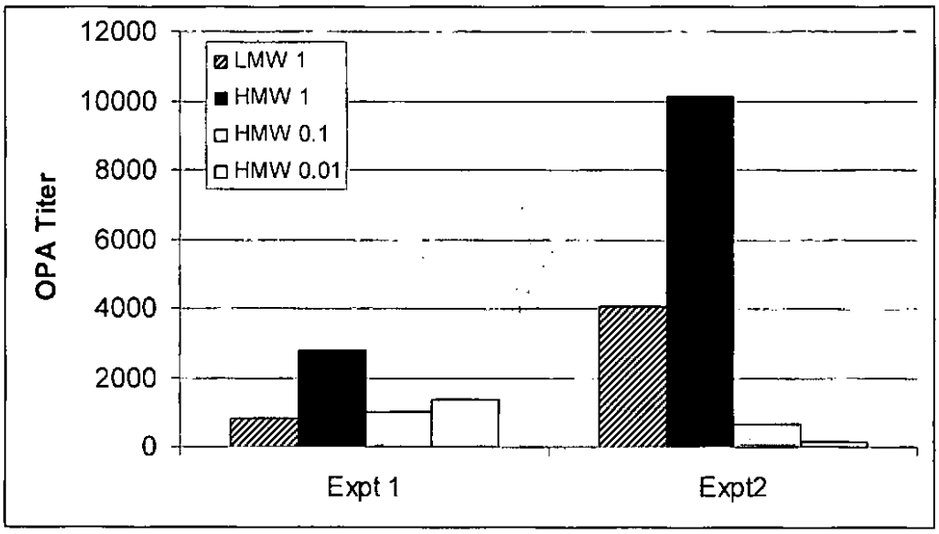
FIGURE 18





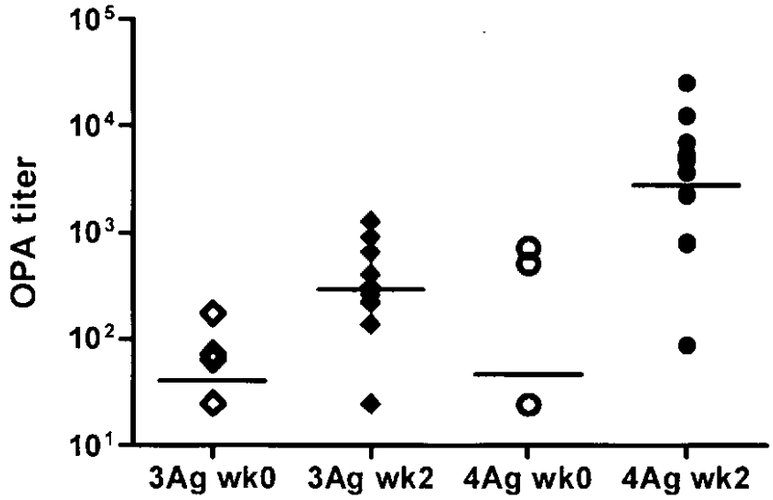
352

FIGURE 19



353

FIGURE 20



354

PATENT COOPERATION TREATY PCT/US2010/039510

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

MOLENDA, Victoria, S.
Pfizer Inc.
Five Giralda Farms
Madison, NJ 07940
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
16 December 2011 (16.12.2011)

Applicant's or agent's file reference
PC54120A (AM102183)

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2010/039510

International filing date *(day/month/year)*
22 June 2010 (22.06.2010)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address
ANDERSON, Annaliesa
49 Hillcrest Drive
Upper Saddle River, New Jersey 07458
United States of America

State of Nationality: US
State of Residence: US
Telephone No.:
Facsimile No.:
E-mail address:

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☐ the address ☒ the nationality ☐ the residence

Name and Address
ANDERSON, Annaliesa
49 Hillcrest Drive
Upper Saddle River, New Jersey 07458
United States of America

State of Nationality: GB
State of Residence: US
Telephone No.:
Facsimile No.:
E-mail address:
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 89 65

Authorized officer
Blanc Mathieu
e-mail pt02.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 02

355

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/US2010/039510

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

MOLENDA, Victoria, S.
Pfizer Inc.
Five Giralda Farms
Madison, NJ 07940
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
05 December 2011 (05.12.2011)

Applicant's or agent's file reference
PC54120A (AM102183)

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2010/039510

International filing date *(day/month/year)*
22 June 2010 (22.06.2010)

1. The following indications appeared on record concerning:

☐ the applicant ☐ the inventor ☒ the agent ☐ the common representative

Name and Address
RUSKIN, Barbara, A.
Ropes & Gray LLP
1211 Avenue of the Americas
New York, New York 10036
United States of America

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.
212-596-9000

Facsimile No.
617-235-9492

E-mail address

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address
MOLENDA, Victoria, S.
Pfizer Inc.
Five Giralda Farms
Madison, NJ 07940
United States of America

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.
+1 845 602 1842

Facsimile No.
+1 845 602 5848

E-mail address
madisonforeignfilling@pfizer.com
☒ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:
The appointment of the agent of record has been revoked. A new agent has been appointed, as indicated in Box 2. The new agent's file reference is : PC54120A (AM102183)

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 89 65

Authorized officer
NTAMACK Soumia
e-mail pt02.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 02

356

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference	FOR FURTHER ACTION	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
PCFC-265-WO1		
International application No.	International filing date *(day/month/year)*	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)*
PCT/US2010/039510	22/06/2010	22/06/2009
Applicant		
WYETH LLC		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 7 sheets.

[X] It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**
   a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:
      [X] the international application in the language in which it was filed
      [ ] a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))
   b. [ ] This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).
   c. [X] With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. [ ] **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. [ ] **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,
   [X] the text is approved as submitted by the applicant
   [ ] the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,
   [X] the text is approved as submitted by the applicant
   [ ] the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,
   a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 20
      [X] as suggested by the applicant
      [ ] as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
      [ ] as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
   b. [ ] none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2010/039510

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

   a. (means)

   [ ] on paper

   [X] in electronic form

   b. (time)

   [X] in the international application as filed

   [ ] together with the international application in electronic form

   [ ] subsequently to this Authority for the purpose of search

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/039510

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/085
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/113222 A2 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; DENOEL PHILIPPE [BE]; POOLMAN JAN [BE]) 11 October 2007 (2007-10-11)	1-7, 12-30, 32-49, 54-90
Y	The whole document, in particular p.29, li.17-37claims 1,2,9,12; example 2	8-11,31, 50-53
	-/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
17 August 2010	27/08/2010

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Chapman, Rob

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DEIVANAYAGAM C C S ET AL: "A novel variant of the immunoglobulin fold in surface adhesins of Staphylococcus aureus: Crystal structure of the fibrinogen-binding MSCRAMM, clumping factor A" EMBO JOURNAL, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB LNKD- DOI:10.1093/EMBOJ/CDF619, vol. 21, no. 24, 16 December 2002 (2002-12-16), pages 6660-6672, XP002523689 ISSN: 0261-4189 the whole document	8-11,31, 50-53
A	NANRA J S ET AL: "Heterogeneous in vivo expression of clumping factor A and capsular polysaccharide by Staphylococcus aureus: Implications for vaccine design" VACCINE, ELSEVIER LTD, GB LNKD- DOI:10.1016/J.VACCINE.2009.01.062, vol. 27, no. 25-26, 26 May 2009 (2009-05-26), pages 3276-3280, XP026122449 ISSN: 0264-410X [retrieved on 2009-02-05] the whole document	1-90
A	JONES C: "Revised structures for the capsular polysaccharides from Staphylococcus aureus Types 5 and 8, components of novel glycoconjugate vaccines" CARBOHYDRATE RESEARCH, PERGAMON, GB LNKD- DOI:10.1016/J.CARRES.2005.02.001, vol. 340, no. 6, 2 May 2005 (2005-05-02), pages 1097-1106, XP004818368 ISSN: 0008-6215 the whole document	1-90
X	WO 2007/113223 A2 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL [US]; BIEMAN) 11 October 2007 (2007-10-11)	1-7, 12-30, 32-49, 54-90
Y	the whole document	8-11,31, 50-53
X	WO 2006/032472 A2 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; CASTADO CINDY [BE]; LECRENIER NICOLAS) 30 March 2006 (2006-03-30)	1-7, 12-30, 32-49, 54-90
Y	the whole document	8-11,31, 50-53

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/039510

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2007/087014 A1 (PAVLIAK VILIAM [US] ET AL) 19 April 2007 (2007-04-19) the whole document	1-90
A	MAIRA-LITRAN T ET AL: "COMPARATIVE OPSONIC AND PROTECTIVE ACTIVITIES OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS CONJUGATE VACCINES CONTAINING NATIVE OR DEACETYLATED STAPHYLOCOCCAL POLY-N-ACETYL-BETA-(1-6)-GLUCOSAMINE" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US LNKD-DOI:10.1128/IAI.73.10.6752-6762.2005, vol. 73, no. 10, 1 October 2005 (2005-10-01), pages 6752-6762, XP009058830 ISSN: 0019-9567 the whole document	1-90
A	COCKAYNE ALAN ET AL: "Molecular cloning of a 32-kilodalton lipoprotein component of a novel iron-regulated Staphylococcus epidermis ABC transporter" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, vol. 66, no. 8, 1 August 1998 (1998-08-01) , pages 3767-3774, XP002205876 ISSN: 0019-9567 the whole document	1-90
A	FATTOM A I ET AL: "Antigenic determinants of Staphylococcus aureus type 5 and type 8 capsular polysaccharide vaccines" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, vol. 66, no. 10, 1 October 1998 (1998-10-01), pages 4588-4592, XP002153789 ISSN: 0019-9567 the whole document	1-90
A	BHASIN NAVNEET ET AL: "Identification of a gene essential for O-acetylation of the Staphylococcus aureus type 5 capsular polysaccharide" MOLECULAR MICROBIOLOGY, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING LTD, GB LNKD-DOI:10.1046/J.1365-2958.1998.00646.X, vol. 27, no. 1, 1 January 1998 (1998-01-01), pages 9-21, XP002452587 ISSN: 0950-382X the whole document	1-90

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/039510

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SCHINEFIELD H ET AL: "Use of staphylococcus aureus conjugate vaccine in patients receiving hemodialysis" NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, THE, MASSACHUSETTS MEDICAL SOCIETY, WALTHAM, MA, US LNKD- DOI:10.1056/NEJMOA011297, vol. 346, no. 7, 14 February 2002 (2002-02-14), pages 491-496, XP002967410 ISSN: 0028-4793 the whole document	1-90

4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2010/039510

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007113222 A2	11-10-2007	AU 2007233705 A1	11-10-2007
		CA 2647441 A1	11-10-2007
		EA 200801839 A1	28-08-2009
		EP 1998802 A2	10-12-2008
		JP 2009531387 T	03-09-2009
		KR 20080111115 A	22-12-2008
		US 2010021503 A1	28-01-2010
WO 2007113223 A2	11-10-2007	AR 060187 A1	28-05-2008
		AR 060188 A1	28-05-2008
		CA 2647450 A1	11-10-2007
		CA 2647455 A1	11-10-2007
		EP 2019689 A2	04-02-2009
		EP 2026841 A2	25-02-2009
		WO 2007113224 A2	11-10-2007
		JP 2009531388 T	03-09-2009
		JP 2009531389 T	03-09-2009
WO 2006032472 A2	30-03-2006	AU 2005287502 A1	30-03-2006
		AU 2005287505 A1	30-03-2006
		AU 2005287532 A1	30-03-2006
		BR PI0515516 A	29-07-2008
		BR PI0515520 A	29-07-2008
		CA 2580103 A1	30-03-2006
		CA 2580137 A1	30-03-2006
		CA 2584290 A1	30-03-2006
		EP 1793849 A2	13-06-2007
		EP 1804833 A2	11-07-2007
		EP 1791559 A2	06-06-2007
		EP 2181714 A2	05-05-2010
		WO 2006032475 A2	30-03-2006
		WO 2006032500 A2	30-03-2006
		JP 2008513406 T	01-05-2008
		JP 2008513409 T	01-05-2008
		KR 20070054732 A	29-05-2007
		KR 20070058631 A	08-06-2007
		NZ 553775 A	28-05-2010
		NZ 553776 A	28-05-2010
		US 2008095777 A1	24-04-2008
		US 2008085289 A1	10-04-2008
US 2007087014 A1	19-04-2007	NONE	

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-177191- -00000-0000

Fecha: 2011-12-22 17:19:26 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 359

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ MODELO DE UTILIDAD ☐ Art 33 Decisión 486/00

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☑ Indicación que se solicita una PCT
- ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☑ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐