



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PC +
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

07-39070

54. TÍTULO "COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS DE
ANTIGENOS DE POLIPÉPTIDOS STAPHYLOCOCCUS
EPIDERMIDIS"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K 39/00

71. SOLICITANTE WYETH

DOMICILIO NUEVA JERSEY, ESTADOS UNIDOS

74. APODERADO ALVARO FORREST ORDÓÑEZ
I.P. No. 20.287

22. BOGOTÁ, D. C., ABRIL 19, 2007

FN 21-05-2002
F 6/12

(FORMA P-10)

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 07-039070-00000-0000

Fecha: 2007-04-19 16:10:29 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTE/II Eje: 378 FASENACIONAL
Act. 411 PRESENTACION Folios: 70

5n

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

1

SOLICITUD DE :

☒ X

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☒ X

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: WYETH

Dirección: Five Giralde Farms, Madison, NJ 07840, Estados Unidos de América

Nacionalidad o Domicilio: Nueva Jersey, Estados Unidos de América

Lugar de Constitución: Delaware, Estados Unidos de América

Teléfono:

Fax:

E-Mail

IDENTIFICACION

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

Dirección: Avenida 82 No.10-82 Piso 6

Teléfono: 634 1500

Fax: 378 2211

E-Mail: office.bogota@bakernet.com

IDENTIFICACION

C.C.

☒ X

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

79.143.366 de

Usaquén

TP 20.281

4

INVENTOR (E8)
(72)

Nombre: SELLMAN, Bret Richard y BAKER, Steven Morris

Dirección: 52 Southern Lane, Warwick, NY 10990, Estados Unidos de América y 64 Sunset Terrace, Highland Mills, NY 10930, Estados Unidos de América, respectivamente.

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidenses

5

PCT (85)

Solicitud Internacional No. PCT/US2005/037746

Publicación Internacional No. WO 2007/001423

Fecha 19-OCT-05

Fecha 04-ENE-07

6

Título (54)

COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS DE ANTÍGENOS DE POLIPÉPTIDO STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS

7

Clasificación Internacional (51)

A61K 39/00

8

Prioridad

SI ☒ X

NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

21-OCT-04

(31) Número de Solicitud

60/620,788

9

Comprobante de pago No. 07-19711

Fecha 08-MAR-07

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

10

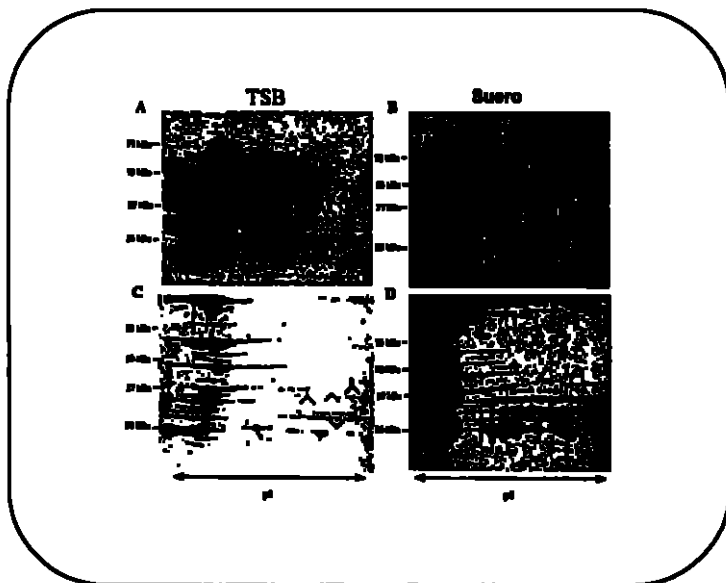
ANEXOS

nnnn2

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Poderes, al fuere el caso
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ 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
- ☐ Acta final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Extractos y notificación de presentación de documento de prioridad.

11

FIGURA CARATERISTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:

ALVARO CORREA ORDOÑEZ

FIRMA:

C.C.79.143.366 de

T.P.

20.281

Itaque

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 19,711
 FECHA : MARZO 8 DE 2007

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-039070-00000-0000

Fecha: 2007-04-19 16:10:29 Dep. 2020 NUECREACIONE
 Tra. 11 PATENTEIYII Evs: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 70

***** CONSIGNACION *****

SITIANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
RAISBECK LARA RODRIGUEZ	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	34689077	08/03/2007	83,304,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. HISTORICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
	TOTAL :	\$ 482,000.00

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

PODER OTORGADO POR WYETH

APOSTILLA

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. Ha sido firmado por MICHELLE L MC GOWAN
3. Quien actúa en calidad de NOTARIO PÚBLICO DE NUEVA JERSEY
4. Lleva el sello de MICHELLE L MC GOWAN, NOTARIO

Certificado

5. En Trenton, Nueva Jersey
6. El 28 de marzo de 2007
7. Por Bradley Abelow, Tesorero de Nueva Jersey
8. N° A287325
9. Sello (Aparece adherido sello dorado)
10. Firma (firmado) Bradley Abelow


JAIME A. GARAVITO B
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
Res 034 de Enero 11 de 1983
MINISTERIO DE JUSTICIA

Texto en inglés y en español mediante el cual **WYETH**, domiciliada en los Estados Unidos de América otorga poder a **ALVARO CORREA ORDOÑEZ y/o OLGA GEORGETTE OTERO y/o RICARDO METKE y/o JUAN PABLO CONCHA**, todos miembros de la firma de abogados Raisbeck, Lara, Rodríguez & Rueda domiciliada en Bogotá, Colombia.

Solicitud de Patente en Colombia titulada: **"COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS DE ANTÍGENOS DE POLIPEPTIDO DE STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIS"**.

Dado y firmado el 23 de marzo de 2007

(Firma ilegible)
William H. Calnan, Subsecretario

[Sello en tinta que dice: "Michelle L. McGowan, Notario Público, Estado de Nueva Jersey. No. 2108903. Calificado en el Condado de Morris. Comisión vence el 09 de febrero de 2011"]

CERTIFICACIÓN NOTARIAL

Texto en inglés y en español mediante el cual el suscrito notario certifica el 23 de marzo de 2007, la existencia legal de la sociedad **WYETH**, así como las funciones y firma de su representante autorizado **William H. Calnan, Subsecretario**, para efectos de lo cual se basó en lo siguiente:

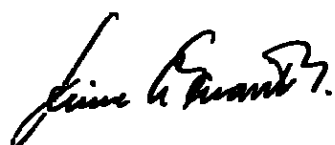
Acta de Reunión de la Junta Directiva fechada abril 27 de 2006.

(Firmado) Michelle L. McGowan, Notario Público

(Sello en tinta que dice: "Michelle L. McGowan, Notario Público, Estado de Nueva Jersey. No. 2108903. Calificado en el Condado de Morris. Comisión vence el 09 de febrero de 2011")

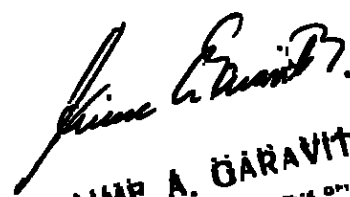
[Sello notarial realzado que dice: "Michelle L. McGowan, Notario Público, Nueva Jersey"]

La anterior es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.



Jaime Armando Garavito Burgos
c.c. N° 19.130.702 de Bogotá
Traductor e Intérprete Oficial según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia

BOGDM5 # 75448



JAIME A. GARAVITO B
TRADUCTOR E INTÉRPRETE OFICIAL
Res 034 de Enero 11 de 1983
MINISTERIO DE JUSTICIA

nnnnn

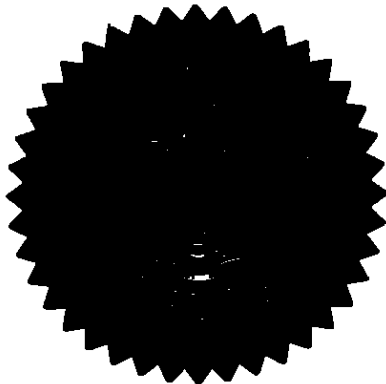
APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
MICHELLE L MC GOWAN
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
MICHELLE L MC GOWAN, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 28TH DAY OF MARCH 2007
7. BY: Bradley Abelow, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A287325
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



Bradley Abelow

Raisbeck, Lara, Rodriguez & Rueda
Av. 82 No. 10 - 62 6th Floor
Bogotá, Colombia

NTT: 860.068.840-3
Tel: +57 1 634 1500
Fax: +57 1 376 2211
www.lahernat.com

000007

POWER OF ATTORNEY

The undersigned.

WYETH

with offices at

Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940,
United States of America

declares that it hereby grants to

**ALVARO CORREA-ORDOÑEZ and/or
OLGA GEORGETTE OTERO and/or
RICARDO METKE and/or
JUAN PABLO CONCHA**

I, all members of the law firm Raisbeck, Lara, Rodriguez & Rueda, with domicile at Av. 82 No. 10 - 62, 6th floor, of Bogotá D. C., Colombia, and for so long as they remain members of the law firm, a full and sufficient power of attorney with respect to Colombian patent application(s) based on PCT/US2005/037746 and entitled "IMMUNOGENIC COMPOSITIONS OF STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS POLYPEPTIDE ANTIGENS" and to obtain patent protection thereof, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of a patent(s) based upon said patent application(s), including filing of assignments, change of name or address, voluntary cancellation; and defending oppositions, cancellations, nullity, writ mandamus, and in general the civil, penal, an administrative processes relating to those rights.

I hereby ratify all lawful actions previously taken on behalf of this company by the aforementioned attorneys with respect to the mentioned matters.

Done and subscribed in

On the 23rd day of March of 2007

Signature of the person issuing the Power

WYETH



William H. Calnan
Assistant Secretary

MICHELLE L. MCCOWAN
Notary Public, State of New Jersey
No. 2108903
Qualified in Morris County
Commission Expires Feb. 9, 2011

PODER DE ABOGADO

La abajo firmada,

WYETH

con oficinas en

Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940,
Estados Unidos de América

declara por el presente que otorga a

**ALVARO CORREA-ORDOÑEZ y/o
OLGA GEORGETTE OTERO y/o
RICARDO METKE y/o
JUAN PABLO CONCHA**

Todos miembros de la firma de abogados Raisbeck, Lara, Rodriguez & Rueda, con domicilio en la Av. 82 No. 10 - 62 Piso 6 en Bogotá D. C., Colombia, y hasta tanto ellos continúen siendo miembros de la firma, poder especial amplio y suficiente con respecto a la solicitud(es) de patente en Colombia basada(s) en PCT/US2005/037746 y titulada "Composiciones inmunogénicas de antígenos de polipeptido de staphylococcus epidermis", y para obtener la protección de patente de la misma, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera autoridades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de la(s) patente(s) de invención basada(s) en la mencionada solicitud de patente, incluyendo presentación de trasposos, cambio de nombre o dirección, cancelación voluntaria; y defensa en oposiciones, cancelaciones, nulidades, la tutela, y en general procesos civiles, penales, administrativos relacionados con estos derechos.

Igualmente, ratifico todo lo actuado en derecho hasta el momento en nombre de esta compañía por cualquiera de los mencionados apoderados en los casos mencionados.

Dado y firmado en

A los 23 días del mes de marzo de 2007

Firma de la persona que firma el Poder

NOTARIAL CERTIFICATION

CERTIFICACION NOTARIAL

On this 23rd day of March
2007, the undersigned Notary

A los 23 días del mes de marzo
de 2007, el suscrito Notario

CERTIFIES

1. That **William H. Calnan**

DA FE

1 Que **William H. Calnan**

set his hand on the foregoing document.

suscribió de su puño y letra el documento que antecede.

2. That the grantor is to me personally known and that he/she has legal capacity to execute the instrument.

2. Que conozco al otorgante y que éste tiene capacidad legal para el otorgamiento.

3. That the grantor has executed the foregoing document as

3 Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de

Assistant Secretary

Subsecretario

of the judicial person **WYETH**

de la persona jurídica **WYETH**

4. That the judicial person **WYETH**
having its home office in

4 Que la persona jurídica **WYETH**
con sede en

**Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940,
United States of America**

**Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940,
Estados Unidos de América**

is duly organized, has present legal existence and that the purposes for which the power of attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

está legalmente constituida, que tiene existencia legal actual y que el acto para el cual se otorga el poder está comprendido entre los que constituyen su objeto social.

5. That the grantor has in fact the referred to authority and that his/her representation is legal.

5 Que el otorgante tiene efectivamente la representación que ostenta y que ésta es legítima.

6. That I have based certifications 3, 4 and 5 above on the following authentic documents for such purpose exhibited to me and which I mention specifically, giving their dates and their origin or source:

6. Que he basado las certificaciones 3, 4 y 5 anteriores en los siguientes documentos auténticos que al efecto se me exhibieron y que menciono específicamente con expresión de sus fechas y de su origen o procedencia:

Minutes of the Board of Directors Meeting held on April 26, 2006.

Acta de la reunión de Junta Directiva celebrada el 26 de abril de 2006

Michelle L. McGowan

El Notario Público

Notary Public

MICHELLE L. MCGOWAN

Notary Public, State of New Jersey

No. 2108903

Qualified in Morris County

Commission Expires Feb. 9, 2011

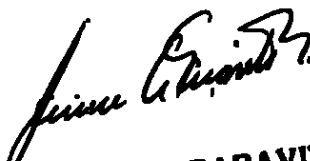
APOSTILLA

nnnng

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. Ha sido firmado por BARBARA A. KIELY
3. Quien actúa en calidad de NOTARIO PÚBLICO DE NUEVA JERSEY
4. Lleva el sello de MICHELLE L MC GOWAN, NOTARIO

Certificado

5. En Trenton, Nueva Jersey
6. El 28 de marzo de 2007
7. Por Bradley Abelow, Tesorero de Nueva Jersey
8. N° A287328
9. Sello (Aparece adherido sello dorado)
10. Firma (firmado) Bradley Abelow


JAIME A. GARAVITO B
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
Nº 034 de Enero 11 de 1983
MINISTERIO DE JUSTICIA

AM101548 L1

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, Michelle L. McGowan, Asociado de Legalizaciones de Wyeth, por medio del presente certifico que la copia anexa ha sido comparada con la Cesión original (para USSN 60/620.788 y cualquier equivalente legal de la misma en un país extranjero, para la invención titulada: "**COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS DE ANTÍGENOS DE POLIPEPTIDO DE STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIS**") fechada noviembre 23, 2004 de Steven Morris Baker; y fechada noviembre 29, 2004 de Bret Richard Sellman a Wyeth y que la mencionada copia es una copia auténtica del original.

Fechada Marzo 22, 2007 en Madison, Nueva Jersey, Estados Unidos de América.

TRADUCCIÓN OFICIAL N° 1304071 al español de un documento escrito en inglés, efectuada por Jaime Armando Garavito Burgos, c.c. N° 19.130.702 de Bogotá, Traductor e Intérprete Oficial Inglés-español-Inglés según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia

Wyeth
(Firmado) Michelle L. McGowan, Asociado de
Legalizaciones

PARA SER USADA EN COLOMBIA

RECONOCIMIENTO

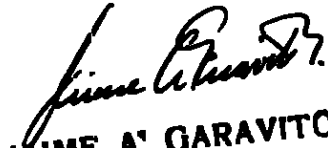
Estado de Nueva Jersey)
)
Condado de Morris)

Hoy marzo 22 de 2007, compareció personalmente ante mí Michelle L. McGowan, Asociado de Legalizaciones de Wyeth, a quien conozco como la persona describa en el anterior instrumento y quien suscribió el mismo y reconoció haberlo suscrito en forma libre y espontánea para los fines consignados en él.

(Firmado) Barbara A. Kiely, Notario Público

(Sello en tinta que dice: "Barbara A. Kiely ID. 33893, Notario Público de Nueva Jersey. Mi comisión vence el 20 de junio de 2009")

(Sello notarial realizado)


JAIME A. GARAVITO B
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
Res 034 de Enero 11 de 1983
MINISTERIO DE JUSTICIA

(Aparece en el encabezamiento de las páginas referentes a las cesiones:
"Archivo No. AM-101548 L
Patentes")

(Aparece en el pie de página de las páginas referentes a las cesiones:
"Cesión de Invención
Solicitud Provisional")

Cesión de Invención

En consideración del pago por la CESIONARIA a la CEDENTE de una contraprestación válida y suficiente cuyo recibo se acusa por medio del presente, los CEDENTES:

TRADUCCIÓN OFICIAL N° 1304071 al español de un documento escrito en inglés, efectuada por Jaime Amando Garavito Burgos, c.c. N° 19.130.702 de Bogotá, Traductor e Intérprete Oficial inglés-español-Inglés según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia

- (1) Nombre Completo del Inventor: Bret Richard SELLMAN
Residencia: 52 Southern Lane, Warwick, NY 10990
Ciudadanía: Estados Unidos de América
- (2) Nombre Completo del Inventor: Steven Morris BAKER
Residencia: 64 Sunset Terrace, Highland, Mills, NY 10930
Ciudadanía: Estados Unidos de América

por medio del presente vende, cede y transfiere a la CESIONARIA:

Wyeth
Five Giralda Farms
Madison, New Jersey 07940

y los sucesores, CESIONARIOS y representantes legales de la CESIONARIA, la totalidad del derecho, título e intereses para los Estados Unidos y sus posesiones territoriales y en todos los países extranjeros, incluyendo todos los derechos a reivindicar prioridad con respecto a la invención titulada:

"COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS DE ANTÍGENOS DE POLIPEPTIDO DE STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIS")

e inventada por los CEDENTES y los siguientes inventores adicionales, si los hubiere:

y que se encuentra en la Solicitud Provisional de los EE.UU. No. 60/620.788 presentada el 21 de octubre de 2004

[También verifique si se están cediendo solicitud(es) adicional(es)]

☒ y cualquier equivalente legal de las mismas en un país extranjero

la fecha de presentación y el número de solicitud de dicha solicitud de los EE.UU. cuando se conozca, se debe insertar arriba, incluyendo el derecho a invocar prioridad, incluyendo todas y cada una de las mejoras divulgadas en la misma y en todas las patentes obtenidas para dicha invención a través de la anterior solicitud y cualquier solicitud provisional, no provisional, continuación, divisional,

TRADUCCIÓN OFICIAL N° 1304071 al español de un documento escrito en inglés, efectuada por Jaime Armando Garavito Burgos, c.c. N° 19.130.702 de Bogotá, Traductor e Intérprete Oficial Inglés-español-Inglés según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia

renovación o sustitución de la misma presentada posteriormente y en cuanto a la patente, cualquier re-expedición o nuevo examen de la misma.

Los CEDENTES por medio del presente acuerdan que no se ha hecho ni se hará o suscribirá ninguna cesión, venta, acuerdo o gravamen que pueda estar en conflicto con esta cesión.

Los CEDENTES autorizan a la CESIONARIA para que haga solicitudes y para que reciban patentes para dicha invención en cualquiera de los mencionados países en su propio nombre, o en el nombre de la CEDENTE o a su elección.

Los CEDENTES acuerdan suscribir u obtener cualquier seguridad adicional necesaria del título a dicha invención y cualquier patente que pueda ser expedida para la misma y a entregar en cualquier momento y a solicitud y expensas de la CESIONARIA cualquier testimonio en cualquier derecho preexistente que impida el patentamiento de la invención, litigio o procedimiento relacionado y a suscribir todos los documentos que puedan ser necesarios o convenientes para perfeccionar el título a dicho invento o cualquier patente que pueda ser otorgada para el mismo a la CESIONARIA, sus sucesores, CESIONARIOS u otros representantes legales y a suscribir, en cualquier momento, a solicitud y expensas de la CESIONARIA, cualquier continuación, continuación parcial, divisional, renovación o sustitución de la misma y en cuanto a patentes a re-expedir o re-examinar las mismas, o cualesquier otras solicitudes adicionales de patentes para dicho invento o cualquier parte del mismo, todas las cuales y cualquier patente que se expida se ceden por medio del presente a la CESIONARIA y prestará todos los juramentos legales o declaraciones y hará todos los actos legales requeridos para adquirirlos, sin compensación adicional,

TRADUCCIÓN OFICIAL N° 1304071 al español de un documento escrito en inglés, efectuada por Jaime Armando Garavito Burgos, c.c. N° 19.130.702 de Bogotá, Traductor e Intérprete Oficial Inglés-español-inglés según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia

pero a expensas de la CESIONARIA, sus sucesores, cesionarios u otros representantes legales.

Los CEDENTES autorizan y solicitan al Comisionado de Patentes expedir todas y cada una de las patentes de los Estados Unidos para dicho invento, que resulte de cualquiera de las solicitudes a su CESIONARIA.

(Firmado)
Bret Richard SELLMAN

Noviembre 29, 2004
Fecha

RECONOCIMIENTO

Estado de Nueva York)
Condado de Rockland)

Declaración juramentada

El 29 de noviembre de 2004, Bret Richard SELLMAN, compareció personalmente ante mí, a quien conozco como la persona describa en el anterior instrumento y quien suscribió el mismo y reconoció haberlo suscrito en forma libre y espontánea para los fines consignados en él.

(Firmado) ROSEANN D. JASTROW, Notario Público

[Sello en tinta que dice: "ROSEANN D. JASTROW. N° 01JA6085816. Calificado en el Condado de Rockland. Mi comisión vence el 06 de enero de 2007")

(Firmado) Steven Morris BAKER

Noviembre 23, 2004
Fecha

RECONOCIMIENTO

Estado de Nueva York)
Condado de Rockland)

Declaración juramentada

El 23 de noviembre de 2004, Steven Morris BAKER, compareció personalmente ante mí, a quien conozco como la persona describa en el anterior instrumento y

TRADUCCIÓN OFICIAL N° 1304071 al español de un documento escrito en Inglés, efectuada por Jaime Armando Garavito Burgos, c.c. N° 19.130.702 de Bogotá, Traductor e Intérprete Oficial inglés-español-inglés según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia

00014

quien suscribió el mismo y reconoció haberlo suscrito en forma libre y espontánea para los fines consignados en él.

(Firmado) ROSEANN D. JASTROW, Notario Público

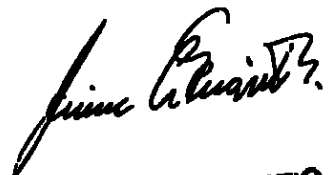
[Sello en tinta que dice: "ROSEANN D. JASTROW. N° 01JA6085816. Calificado en el Condado de Rockland. Mi comisión vence el 06 de enero de 2007")

La anterior es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.



Jaime Armando Garavito Burgos
c.c. N° 19.130.702 de Bogotá
Traductor e Intérprete Oficial según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia

BOGDM5 # 75427



JAIME A. GARAVITO B.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
Seg 034 de Enero 11 de 1983
MINISTERIO DE JUSTICIA

15

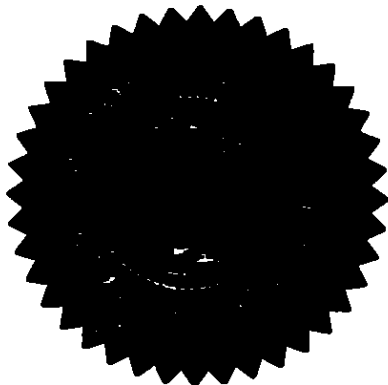
APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
BARBARA A KIELY
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
BARBARA A KIELY, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 28TH DAY OF MARCH 2007
7. BY: Bradley Abelow, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A287328
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



Bradley Abelow

AM101548 L1

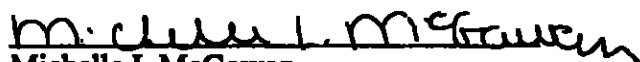
AFFIDAVIT

I, Michelle L. McGowan, Legalization Associate, Wyeth, do hereby certify that the attached copy has been compared with the original Assignment (for U.S.S.N.

60/620,788 and any legal equivalent thereof in a foreign country, for the invention entitled: "IMMUNOGENIC COMPOSITIONS OF STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS POLYPEPTIDE ANTIGENS") dated November 23, 2004 from Steven Morris Baker, and dated November 29, 2004 from Bret Richard Sellman to Wyeth and that the said copy is a true copy of the original.

Dated this 22nd day of March, 2007, at Madison, New Jersey, United States of America.

Wyeth


Michelle L. McGowan
Legalization Associate

TO BE USED IN COLOMBIA

ACKNOWLEDGMENT

State of New Jersey)
)
County of Morris)

On this 22nd day of March, 2007, before me personally appeared Michelle L. McGowan, Legalization Associate of Wyeth, to me known and known to me to be the individual described in and who executed the foregoing instrument, and he acknowledged to me that he executed the same.

Barbara A. Kiely ID. 33893
Notary Public of New Jersey
My Commission Expires June 28, 2009


Notary Public

Assignment of Invention

In consideration of the payment by ASSIGNEE to ASSIGNOR of good and valuable consideration, the receipt of which is hereby acknowledged,
ASSIGNOR:

- (1) Full Name of Inventor: Bret Richard SELLMAN
Residence: 52 Southern Lane, Warwick, NY 10990
Citizenship: United States of America
-

- (2) Full Name of Inventor: Steven Morris BAKER
Residence: 64 Sunset Terrace, Highland Mills, NY 10930
Citizenship: United States of America
-

hereby sells, assigns and transfers to ASSIGNEE:

Wyeth
Five Girarde Farms
Madison, New Jersey 07940

and the successors, assigns and legal representatives of the ASSIGNEE the entire right, title and interest for the United States and its territorial possessions and in all foreign countries, including all rights to claim priority, in and to the invention entitled:

**IMMUNOGENIC COMPOSITIONS OF STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS
POLYPEPTIDE ANTIGENS**

and invented by ASSIGNOR and the following additional inventors, if any:

and which is found in U.S. Provisional Application No. 60/620,788 filed on: October 21, 2004

[also check if foreign application(s) is(are) also being assigned]

☒ and any legal equivalent thereof in a foreign country,

the date of filing and application number of said U.S. application when known, to be inserted above, including the right to claim priority, including any and all improvements disclosed therein, and in and to all Letters Patent to be obtained for said invention by the above application or any subsequently filed provisional, nonprovisional, continuation, divisional, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patent any reissue or re-examination thereof.

ASSIGNOR hereby covenants that no assignment, sale, agreement or encumbrance has been or will be made or entered into which would conflict with this assignment.

ASSIGNOR authorizes ASSIGNEE to make applications for and to receive Letters patent for said invention in any of said countries in its own name, or in ASSIGNOR's name, at its election.

ASSIGNOR covenants and agrees to execute or procure any further necessary assurance of the title to said invention and any Letters Patent which may issue therefore and to, at any time, upon the request and at the expense of ASSIGNEE deliver any testimony in any interference, litigation or proceeding related thereto and execute all papers that may be necessary or desirable to perfect the title to said invention or any Letters Patent which may be granted therefore in ASSIGNEE, its successors, assigns or other legal representatives, and that to, at any time, upon the request and at the expense of ASSIGNEE execute any continuation, continuation-in-part, divisional, renewal or substitute thereof, and as to Letters Patent and reissue or re-examination thereof, or any other additional applications of Letters Patent for said invention or any part thereof, all of which applications and any Letters Patent issuing thereon are hereby assigned to ASSIGNEE, and will make all rightful oaths or declarations, and do all lawful acts requisite for procuring the same therein, without further compensation, but at the expense of ASSIGNEE, its successors, assigns or other legal representatives.

ASSIGNOR authorizes and requests the Commissioner of Patents to issue any and all Letters Patent of the United States for said invention, resulting from any of the aforesaid applications to its ASSIGNEE.

Bret Richard SELLMAN
Bret Richard SELLMAN

11/29/04
Date

ACKNOWLEDGMENT

State of New York }
County of Rockland } ss:

On the 29th day of November 2004, Bret Richard SELLMAN personally appeared before me, known by me to be the same person described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.

ROSEANN D. JASTROW
NO. 01JA808816
QUALIFIED IN ROCKLAND COUNTY
MY COMMISSION EXPIRES 01-08-2007

Rose Ann D. Jastrow
Notary Public

Steven Morris BAKER
Steven Morris BAKER

11/23/2004
Date

ACKNOWLEDGMENT

State of New York }
County of Rockland } ss:

On the 23 day of November 2004, Steven Morris BAKER personally appeared before me, known by me to be the same person described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.

ROSEANN D. JASTROW
NO. 01JA808816
QUALIFIED IN ROCKLAND COUNTY
MY COMMISSION EXPIRES 01-08-2007

Rose Ann D. Jastrow
Notary Public

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
4 January 2007 (04.01.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/001423 A2

(51) International Patent Classification: Not classified

(21) International Application Number:
PCT/US2005/037746

(22) International Filing Date: 19 October 2005 (19.10.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/620,788 21 October 2004 (21.10.2004) US

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

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): SELLMAN, Bret,
Richard [US/US]; 52 Southern Lane, Warwick, NY 10990
(US). BAKER, Steven, Morris [US/US]; 64 Sunset Ter-
race, Highland Mills, NY 10930 (US).

(74) Agent: FONTENOT, J., Darrell; Wyeth, Patent Law De-
partment, Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AI, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,

KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY,
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,
SI, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

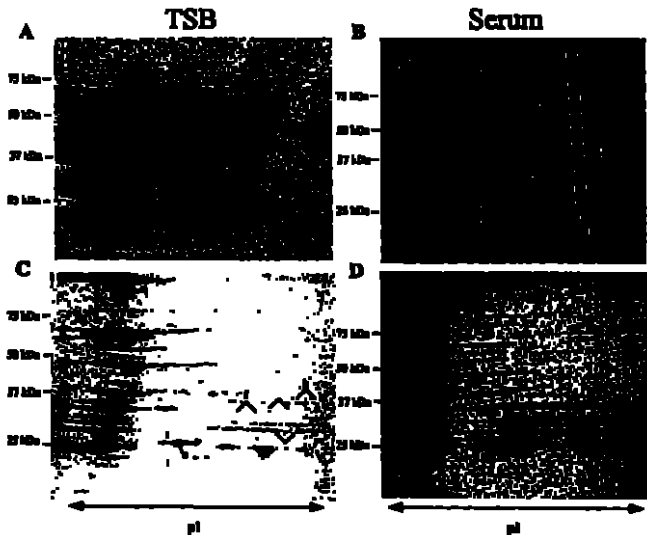
(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KI, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW). Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM).
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR). OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted
a patent (Rule 4.17(ii)) for the following designations AE,
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE,
EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN,
IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW. ARIPO patent (BW, GH, GM, KE,

[Continued on next page]

(54) Title: IMMUNOGENIC COMPOSITIONS OF STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS POLYPEPTIDE ANTIGENS



(57) Abstract: The present invention relates to immunogenic compositions, comprising polypeptides isolated from *Staphylococcus epidermidis*. The invention also relates to polynucleotides encoding *Staphylococcus epidermidis* polypeptides and their use in immunogenic compositions. In addition, the invention relates to methods of inducing an immune response in mammals against *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* using immunogenic compositions of the *Staphylococcus epidermidis* polypeptides and polynucleotides. The invention also relates to methods for detecting *Staphylococcus epidermidis* in a biological sample.



LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

— as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii)) for all designations

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

IMMUNOGENIC COMPOSITIONS OF *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS* POLYPEPTIDE ANTIGENS

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to immunogenic compositions, comprising
5 polypeptides isolated from *Staphylococcus epidermidis*. The invention also relates to
polynucleotides encoding *Staphylococcus epidermidis* polypeptides and their use in
immunogenic compositions. In addition, the invention relates to methods of inducing
an immune response in mammals against *Staphylococcus epidermidis* and
10 *Staphylococcus aureus* using immunogenic compositions of the *Staphylococcus*
epidermidis polypeptides and polynucleotides. The invention also relates to methods
for detecting *Staphylococcus epidermidis* in a biological sample.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Staphylococcus epidermidis is a major component of the normal human
microbial flora on the skin and mucous membranes and was once considered only a
15 contaminant when cultured from an infected patient. See Hellmann, C. and G.
Peters, *Biology and pathogenicity of Staphylococcus epidermidis*, In *Gram-positive*
pathogens, V.A. Fischetti, Editor. 2000, American Society for Microbiology:
Washington, D.C. p. 442-449; von Eiff, C., et al., *Lancet Infect Dis*, 2(11): p. 877-85
(2002). It is now widely accepted to be an opportunistic pathogen of great
20 importance and a leading cause of nosocomial bloodstream infections. See Am J
Infect Control, 27: p. 520-32 (1999); Diekema, D.J., et al., *Int J Antimicrob Agents*,
20(6): p. 412-8 (2002); Edmond, M.B., et al., *Clin Infect Dis*, 29(2): p. 239-44 (1999).
These infections are primarily associated with the presence of an indwelling foreign
polymer body such as a venous catheter, prosthetic joint or prosthetic heart valve.
25 See Hellmann, C. and G. Peters, *Biology and pathogenicity of Staphylococcus*
epidermidis, In *Gram-positive pathogens*, V.A. Fischetti, Editor. 2000, American
Society for Microbiology: Washington, D.C. p. 442-449; von Eiff, C., et al., *Lancet*
Infect Dis, 2(11): p. 877-85 (2002). Infection is thought to result from introduction of
Staphylococcus epidermidis from the patient's skin upon insertion of the prosthetic
30 device. Colonization and subsequent biofilm formation can lead to bacteremia with
the potential for hematogenous spread to other sites in the body. These infections

are often difficult to treat, arising from the reduced killing of bacteria within a biofilm by antibiotics and also an increase in antibiotic resistance among clinical isolates. See Diekema, D.J., *et al.*, *Int J Antimicrob Agents*, 20(6): p. 412-8 (2002); Edmond, M.B., *et al.*, *Clin Infect Dis*, 29(2): p. 239-44 (1999); Lewis, K., *Antimicrob Agents Chemother*, 45(4): p. 999-1007 (2001); Raad, I. *et al.*, *Clin Infect Dis*, 28(5): p. 1182-7 (1998). *Staphylococcus epidermidis* with reduced susceptibility to vancomycin have been reported. See Sanyal, D. and D. Greenwood, *J Med Microbiol.*, 39(3): p. 204-10 (1993); Sanyal, D., *et al.*, *Lancet*, 337(8732): p. 54 (1991). Difficulty treating these infections necessitates the use of immunization as a means to prevent infection.

- 10 Biofilm formation is a major virulence determinant for *Staphylococcus epidermidis* infections. Consequently, research on *Staphylococcus epidermidis* surface proteins has focused on those proteins involved in biofilm formation. These proteins have been subdivided into groups based on their involvement in the two major steps of biofilm formation: 1) primary attachment, staphylococcal surface
- 15 protein-1 (SSP-1), autolysin (AtlE), Fbe (SdrG) and GahD and 2) bacterial cell accumulation, Bap homologous protein (Bhp), accumulation associated protein (AAP) and autolysin (AtlE). See von Eiff, C., *et al.*, *Lancet Infect Dis*, 2002, 2(11): p. 677-85; Vuong, C., *et al.*, *J Infect Dis*, 188(5): p. 708-18 (2003); Veenstra, G.J., *et al.*, *J Bacteriol.*, 178(2): p. 537-41 (1996); Rupp, M.E., *et al.*, *J Infect Dis*, 183(7): p.
- 20 1038-42 (2001); Hussain, M., *et al.*, *Infect Immun*, 65(2): p. 519-24 (1997); Nilsson, M., *et al.*, *Infect Immun*, 66(6): p. 2666-73 (1998); Davis, S.L., *et al.*, *J Biol Chem*, 276(30): p. 27799-805 (2001); and Bowden, M.G., *et al.*, *J Biol Chem*, 277(45): p. 43017-43023 (2002). Comparatively less effort has been exerted towards the identification of surface proteins expressed upon exposure to the environmental cues
- 25 within the host or those involved in host-parasite interactions.

- Staphylococcus epidermidis* must undergo a transition from commensal to pathogen and adapt to its microenvironment within the host. For a commensal to transition to a pathogen it must gain access to host tissue, sense changes in its environment, alter gene expression so that it is able to evade host defenses, attach
- 30 and adhere to host factors, grow and divide in the presence of different nutrients and host defenses. Proteins on the bacterial surface make initial contact with the new environment within the host. The many functions of these proteins include sensing

the environment, scavenging and transporting nutrients, defending against the host immune system and binding host proteins. Surface exposed proteins can also serve as points of contact or recognition by the host immune system and can be targets for a humoral immune response against the bacterium. Josefsson, E., *et al.*, J Infect Dis, 184(12): p. 1572-80 (2001); Swiatlo, E., *et al.*, Infect Immun, 71(12): p. 7149-53 (2003); Grifantini, R., *et al.*, Nat Biotechnol, 20(9): p. 914-21 (2002). Thus, there is an immediate need for identifying promising candidates among *Staphylococcus epidermidis* proteins for use in immunogenic compositions that induce immune responses to disease causing serotypes of *Staphylococcus epidermidis*.

10 SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides an immunogenic composition comprising a polypeptide having an amino acid sequence chosen from one or more of SEQ ID NO: 1 through SEQ ID NO: 32, a biological equivalent thereof, or a fragment thereof. In a particular embodiment, the polypeptide is immunoreactive with antibodies in the serum of rabbits infected with *Staphylococcus epidermidis*. In another embodiment, the polypeptide binds to one or more rabbit serum proteins.

In certain embodiments, the immunogenic composition further comprises a pharmaceutically acceptable carrier. In other embodiments, the immunogenic compositions of the invention also comprise one or more adjuvants. In still another embodiment, the immunogenic composition further comprises a *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide antigen. In still another embodiment, the immunogenic composition further comprises a *Staphylococcus aureus* polysaccharide or polypeptide antigen.

The present invention provides immunogenic compositions, comprising a polypeptide isolated from *Staphylococcus epidermidis*.

The present invention provides an immunogenic composition comprising a *Staphylococcus epidermidis* polypeptide wherein the polypeptide further comprises heterologous amino acids. In a particular embodiment, the polypeptide is a fusion polypeptide. In another embodiment, the polypeptide is a recombinant polypeptide. In still another embodiment, the invention provides an immunogenic composition

comprising a *Staphylococcus epidermidis* polypeptide wherein the polypeptide comprises a neutralizing epitope of *Staphylococcus epidermidis*. In a certain embodiment, the polypeptide is a lipoprotein.

The present invention further provides immunogenic compositions,
5 comprising a *Staphylococcus epidermidis* polypeptide, wherein the polypeptide is encoded by a polynucleotide comprising a nucleotide sequence having at least about 95% identity to a nucleotide sequence chosen from one of SEQ ID NO: 33 through SEQ ID NO: 64 or a degenerate variant thereof, or a fragment thereof. In a particular
10 embodiment, the *Staphylococcus epidermidis* polynucleotide sequence is selected from the group consisting of SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, and SEQ ID NO: 62, or a degenerate variant thereof, or a fragment thereof.

The present invention provides an immunogenic composition, wherein the
15 polynucleotide is derived from *Staphylococcus epidermidis*. In a particular embodiment, the polynucleotide further comprises heterologous nucleotides. In another embodiment, the polynucleotide is in an expression vector. In still another embodiment, the expression vector is plasmid DNA. In a certain embodiment, the polynucleotide is a recombinant polynucleotide. In another embodiment, the
20 polynucleotide is operatively linked to one or more gene expression regulatory elements. In still another embodiment, the polynucleotide directs the expression of a neutralizing epitope of *Staphylococcus epidermidis*.

The invention also provides an immunogenic composition comprising a
25 *Staphylococcus epidermidis* polypeptide encoded by a polynucleotide, wherein the immunogenic composition further comprises a transfection facilitating agent. In a particular embodiment, said transfection facilitating agent is bupivacaine.

The present invention also provides a method of inducing an immune
response against *Staphylococcus epidermidis* comprising administering to a mammal an immunogenic amount of a composition comprising: a polypeptide having an amino
30 acid sequence chosen from one or more of SEQ ID NO: 1 through SEQ ID NO: 32 or

a biological equivalent thereof, or a fragment thereof, and a pharmaceutically acceptable carrier.

In addition, the present invention provides a method of inducing an immune response against *Staphylococcus epidermidis* comprising administering to a mammal
5 an immunogenic amount of a composition comprising: a polynucleotide having a nucleotide sequence chosen from one or more of SEQ ID NO: 33 through SEQ ID NO: 64, a degenerate variant thereof, or a fragment thereof and a pharmaceutically acceptable carrier.

In one embodiment, the invention provides an immunogenic composition
10 comprising a polynucleotide having a nucleotide sequence chosen from one of SEQ ID NO: 33 through SEQ ID NO: 64, a degenerate variant thereof, or a fragment thereof and is comprised in an expression vector. In another embodiment, the polynucleotide is derived from *Staphylococcus epidermidis*. In still another embodiment the polynucleotide comprises heterologous nucleotides.

In a certain embodiment, the invention provides a method for the detection
15 and/or identification of *Staphylococcus epidermidis* in a biological sample comprising: (a) contacting the sample with an oligonucleotide probe of a polynucleotide comprising the nucleotide sequence chosen from one of SEQ ID NO: 33 through SEQ ID NO: 64, or a degenerate variant thereof, or a fragment thereof, under conditions
20 permitting hybridization; and (b) detecting the presence of hybridization complexes in the sample, wherein hybridization complexes indicate the presence of *Staphylococcus epidermidis* in the sample.

In other embodiments, the invention provides a method for the detection
and/or identification of antibodies to *Staphylococcus epidermidis* in a biological
25 sample comprising: (a) contacting the sample with a polypeptide comprising an amino acid sequence chosen from one of SEQ ID NO: 1 through SEQ ID NO: 32 or a biological equivalent thereof, or a fragment thereof, under conditions permitting immune complex formation; and detecting the presence of immune complexes in the sample, wherein immune complexes indicate the presence of *Streptococcus*
30 *pneumoniae* in the sample.

In a particular embodiment, the immunogenic composition comprises a *Staphylococcus epidermidis* polypeptide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 30, a biological equivalent thereof, or a fragment thereof. In another embodiment, the immunogenic composition comprises a *Staphylococcus epidermidis* polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 62, or a degenerate variant thereof, or a fragment thereof.

In yet another embodiment, the invention provides a method of inducing an immune response against *Staphylococcus aureus* comprising administering to a mammal an immunogenic amount of a composition comprising: a *Staphylococcus epidermidis* polypeptide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 30, a biological equivalent thereof, or a fragment thereof.

In a particular embodiment, the invention provides a method of inducing an immune response against *Staphylococcus aureus* comprising administering to a mammal an immunogenic amount of a composition comprising: a *Staphylococcus epidermidis* polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 62, or a degenerate variant thereof, or a fragment thereof.

24

... nm²**BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS**

Figure 1 depicts protein expression profiles of cell wall fractions from *S. epidermidis* 0-47 grown in TSB (1A and 1C) or 70% rabbit serum (1B and 1D), which were compared by 2D gel electrophoresis. Proteins were separated on pH 4-7 IPG strips in the first dimension followed by SDS-PAGE in the second dimension, transferred to nitrocellulose and detected by fluorescent stain (1A and 1C). Immunoreactive proteins were visualized with immune sera (1B and 1D) from rabbits infected with *S. epidermidis* 0-47. Molecular weight markers are labeled to the left.

Figure 2 depicts fluorescent stained blot (2A) and immunoblot (2B) of a cell surface fraction from *S. epidermidis* 0-47 grown in 70% rabbit serum separated on pH 4-7 IPG strips in the first dimension and SDS-PAGE in the second dimension. The proteins in the spots were identified by mass spec analysis.

Figure 3 depicts proteins, which were eluted from the surface of *S. epidermidis* 0-47 grown in TSB or 70% rabbit serum with increasing concentrations of NaCl or 4.0M urea. Asterisks indicate enriched proteins eluted from the surface of *S. Epl* grown in the presence of serum. Bacteria were washed 3X with TBS then sequentially with 0.5M and 1.0 M NaCl and 4.0 M urea. Protein concentrations were determined for each of the samples and 0.75 µg was run on a 4-20% gradient gel. No protein was detected by protein assay in the samples eluted from the surface of TSB-grown bacteria (lanes 2-5), so 25 µl was loaded onto the gel. Lane 1, rabbit serum; Lanes 2 and 6 - 0.15M NaCl eluate; Lanes 3 and 7 - 0.5M NaCl, Lanes 4 and 8 - 1.0 M NaCl; Lane 5 and 9 - 4.0 M urea.

Figure 4 depicts a 2D transfer of cell surface proteins from *S. epidermidis*, which was fluorescently stained for protein (4A) and probed with biotinylated serum proteins (4B) eluted from *S. epidermidis* grown in 70% rabbit serum. The spots were visualized with a streptavidin-alkaline phosphatase conjugate. The proteins in the spots were identified by mass spectroscopy.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Upon exposure to the bloodstream of the host, invading bacteria encounter environmental cues specific to the new environment. These cues are detected by the bacteria and signal adaptive changes in protein expression that may be detectable in cell wall purified proteins. Often, proteins and carbohydrates at the bacterial cell wall are candidates for inclusion in immunogenic compositions for treating or preventing bacterial infections. Whether an upregulated protein interacts with the host or plays a role in nutrient acquisition, it is important to the bacteria and therefore plays a role in survival of the bacteria and pathogenesis. Growth of bacteria in body fluids (i.e. serum, peritoneal dialysate fluid, and urine) has been used as a model system to mimic some of the signals bacteria encounter within the host. See Wiltshire, M.D. and S.J. Foster, *Infect Immun*, 69(8): p. 5198-202 (2001); Shepard, B.D. and M.S. Gilmore, *Infect Immun*, 70(8): p. 4344-52 (2002); Smith, D.G., et al., *Infect Immun*, 59(2): p. 817-24 (1991); McDermid, K.P., et al., *Infect Immun*, 61(5): p. 1743-9 (1993). One or more of these culture conditions was found to alter gene expression in *Enterococcus faecalis*, *S. aureus* and *Staphylococcus epidermidis* and those proteins identified as being increased in expression in the altered culture conditions were found to belong to different classes of proteins having a variety of functions. See Wiltshire, M.D. and S.J. Foster, *Infect Immun*, 69(8): p. 5198-202 (2001); Shepard, B.D. and M.S. Gilmore, *Infect Immun*, 70(8): p. 4344-52 (2002).

The most common predisposing factor for a *Staphylococcus epidermidis* infection is the implantation of a prosthetic device. An implanted prosthetic device becomes coated with plasma and matrix proteins including fibrinogen, vitronectin, von Willebrand factor and fibronectin. See von Eiff, C., et al., *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 18(12): p. 843-6 (1999). These proteins often act as ligands for *Staphylococcal epidermidis* surface proteins, thus allowing the bacteria to bind and colonize the prosthetic device. *Staphylococcus epidermidis* is known to express proteins that bind to fibrinogen, vitronectin and fibronectin. See Nilsson, M., et al., *A fibrinogen-binding protein of Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun*, 68(8), p. 2666-73 (1998); Davis, S.L., et al., *J Biol Chem*, 276(30), p. 27798-805 (2001); Williams, R.J., et al., *Infect Immun*, 70(12), p. 6806-10 (2002); Hellmann, C., et al.,

nnnn

Mol Microbiol, 24(5), p. 1013-24 (1997). It is reasonable to expect that *Staphylococcus epidermidis* will bind additional serum proteins in making the transition from commensal to pathogen.

5 The invention described hereinafter addresses the need for *Staphylococcus epidermidis* immunogenic compositions that effectively prevent or treat most or all of the disease caused by serotypes of *Staphylococcus epidermidis*. The invention further addresses the need for methods of diagnosing *Staphylococcus epidermidis* infection. The present invention has identified *Staphylococcus epidermidis* open reading frames, hereinafter ORFs, which encode antigenic polypeptides. More particularly, the *Staphylococcus epidermidis* ORFs encode polypeptides that serve
10 as potential antigenic polypeptides in immunogenic compositions. In certain embodiments, the invention comprises *Staphylococcus epidermidis* polynucleotide ORFs encoding surface localized, exposed, secreted or membrane associated polypeptide antigens.

15 In other embodiments, the invention comprises vectors comprising ORF sequences and host cells or animals transformed, transfected or infected with these vectors. The invention also comprises transcriptional gene products of *Staphylococcus epidermidis* ORFs, such as, for example, mRNA, antisense RNA, antisense oligonucleotides and ribozyme molecules, which can be used to inhibit or
20 control growth of the microorganism. The invention relates also to methods of detecting these nucleic acids or polypeptides and kits for diagnosing *Staphylococcus epidermidis* infection. The invention also relates to immunogenic compositions for the prevention and/or treatment of bacterial infection, in particular infection caused by or exacerbated by *Staphylococcus epidermidis*. In particular embodiments, the
25 immunogenic compositions are used for the treatment or prevention of systemic diseases, which are induced or exacerbated by *Staphylococcus epidermidis*. In other embodiments, the immunogenic compositions are used for the treatment or prevention of non-systemic diseases, which are induced or exacerbated by *Staphylococcus epidermidis*.

30

00001

A. *Staphylococcus epidermidis* ORF Polynucleotides and Polypeptides

Isolated and purified *Staphylococcus epidermidis* ORF polynucleotides are identified which are used in the production of *Staphylococcus epidermidis* polypeptides for inclusion in immunogenic compositions. More specifically, in certain
 5 embodiments, the ORFs encode *Staphylococcus epidermidis* surface localized, exposed, membrane associated or secreted polypeptides, particularly antigenic polypeptides. Thus, in one aspect, the present invention identifies isolated and purified polynucleotides (ORFs) that encode *Staphylococcus epidermidis* surface
 10 localized, exposed, membrane associated or secreted polypeptides for inclusion in immunogenic compositions. In particular embodiments, a polynucleotide of the present invention is a DNA molecule, wherein the DNA may be genomic DNA, chromosomal DNA, plasmid DNA or cDNA. In another embodiment, a polynucleotide is a recombinant polynucleotide, which encodes a *Staphylococcus epidermidis* polypeptide comprising an amino acid sequence that has at least 95% identity to an
 15 amino acid sequence of one of SEQ ID NO: 1 through SEQ ID NO: 32 or a fragment thereof. In another embodiment, an isolated and purified ORF polynucleotide comprises a nucleotide sequence that has at least 95% identity to one of the ORF nucleotide sequences of SEQ ID NO: 33 through SEQ ID NO: 64, a degenerate variant thereof, or a complement thereof. In one embodiment, an ORF
 20 polynucleotide of one of SEQ ID NO: 33 through SEQ ID NO: 64 is comprised in a plasmid vector and expressed in a prokaryotic host cell.

As used hereinafter, the term "polynucleotide" means a sequence of nucleotides connected by phosphodiester linkages. Polynucleotides are presented hereinafter in the direction from the 5' to the 3' direction. A polynucleotide of the
 25 present invention can comprise from about 10 to about several hundred thousand base pairs. In one embodiment, a polynucleotide comprises from about 10 to about 3,000 base pairs. Example lengths of particular polynucleotide are set forth hereinafter.

A polynucleotide as described herein can be a deoxyribonucleic acid (DNA)
 30 molecule, a ribonucleic acid (RNA) molecule, or analogs of the DNA or RNA generated using nucleotide analogs. The nucleic acid molecule can be single-

stranded or double-stranded, but preferably is double-stranded DNA. Where a polynucleotide is a DNA molecule, that molecule can be a gene, a cDNA molecule or a genomic DNA molecule. Nucleotide bases are indicated hereinafter by a single letter code: adenine (A), guanine (G), thymine (T), cytosine (C), inosine (I) and uracil (U).

"Isolated" means altered "by the hand of man" from the natural state. If a composition or substance occurs in nature, in order for it to be considered "isolated" it must have been changed or removed from its original environment, or both. For example, a polynucleotide or a polypeptide naturally present in a living animal is not "isolated," but the same polynucleotide or polypeptide separated from the coexisting materials of its natural state is "isolated," as the term is employed hereinafter.

As used herein, an "isolated" polynucleotide is free of sequences which naturally flank the nucleic acid (i.e., sequences located at the 5' and 3' ends of the nucleic acid) in the genomic DNA of the organism from which the nucleic acid is derived. For example, in various embodiments, the isolated *Staphylococcus epidermidis* nucleic acid molecule can contain less than about 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0.5 kb or 0.1 kb of nucleotide sequences which naturally flank the nucleic acid molecule in genomic DNA of the cell from which the nucleic acid is derived. However, the *Staphylococcus epidermidis* nucleic acid molecule can be fused to other protein encoding or regulatory sequences and still be considered isolated.

ORF polynucleotides and thus the polypeptides described herein may be obtained using standard cloning and screening techniques from a cDNA library derived from mRNA. Polynucleotides of the invention can also be obtained from natural sources such as genomic DNA libraries (e.g., a *Staphylococcus epidermidis* library) or can be synthesized using well known and commercially available techniques.

Also encompassed herein are nucleic acid molecules that differ from the nucleotide sequences shown in SEQ ID NO:33 through SEQ ID NO:84 (and fragments thereof) due to degeneracy of the genetic code and thus encode the same *Staphylococcus epidermidis* polypeptide as that encoded by the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:33 through SEQ ID NO:84.

Orthologues and allelic variants of the *Staphylococcus epidermidis* polynucleotides can readily be identified using methods well known in the art. Allelic variants and orthologues of the polynucleotides will comprise a nucleotide sequence that is typically at least about 70-75%, more typically at least about 80-85%, and
5 most typically at least about 90-95% or more homologous to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:33 through SEQ ID NO:84, or a fragment of these nucleotide sequences. Such nucleic acid molecules can readily be identified as being able to hybridize under stringent conditions, to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:33 through SEQ ID NO:84, or a fragment of these nucleotide sequences.

10 Moreover, the polynucleotides can comprise only a fragment of the coding region of a *Staphylococcus epidermidis* polynucleotide or gene, such as a fragment of one of SEQ ID NO:33 through SEQ ID NO:84. In certain embodiments, such fragments encode immunogenic fragments.

When these *Staphylococcus epidermidis* ORF polynucleotides of the
15 invention are used for the recombinant production of *Staphylococcus epidermidis* polypeptides for inclusion in immunogenic compositions, the polynucleotide may include the coding sequence for the mature polypeptide, by itself, or the coding sequence for the mature polypeptide in reading frame with other coding sequences, such as those encoding a leader or secretory sequence, a pre-, or pro- or prepro-
20 protein sequence, or other fusion peptide portions. For example, a marker sequence which facilitates purification of the fused polypeptide can be linked to the coding sequence (see Genitz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:821-824, 1989, incorporated by reference hereinafter in its entirety). Thus, contemplated herein is the preparation of polynucleotides encoding fusion polypeptides permitting His-tag
25 purification of expression products. The polynucleotide may also contain non-coding 5' and 3' sequences, such as transcribed, non-translated sequences, splicing and polyadenylation signals.

Thus, a polynucleotide encoding a polypeptide for inclusion in immunogenic
compositions of the present invention, including homologs and orthologs from
30 species other than *Staphylococcus epidermidis*, such as *Staphylococcus aureus* may be obtained by a process which comprises the steps of screening an appropriate

library under stringent hybridization conditions with a labeled probe having the sequence of one of SEQ ID NO:33 through SEQ ID NO:64, a fragment thereof; and isolating full-length cDNA and genomic clones containing the polynucleotide sequence. Such hybridization techniques are well known to the skilled artisan. The skilled artisan will appreciate that, in many cases, an isolated cDNA sequence will be incomplete, in that the region coding for the polypeptide is cut short at the 5' end of the cDNA. This is a consequence of reverse transcriptase, an enzyme with inherently low "processivity" (a measure of the ability of the enzyme to remain attached to the template during the polymerization reaction), failing to complete a DNA copy of the mRNA template during first strand cDNA syntheses.

Thus, in certain embodiments, the polynucleotide sequence information provided herein allows for the preparation of relatively short DNA (or RNA) oligonucleotide sequences having the ability to specifically hybridize to gene sequences of the selected polynucleotides disclosed hereinafter. The term "oligonucleotide" as used hereinafter is defined as a molecule comprised of two or more deoxyribonucleotides or ribonucleotides, usually more than three (3), and typically more than ten (10) and up to one hundred (100) or more (although preferably between twenty and thirty). The exact size will depend on many factors, which in turn depends on the ultimate function or use of the oligonucleotide. Thus, in particular embodiments, nucleic acid probes of an appropriate length are prepared based on a consideration of a selected nucleotide sequence, e.g., a sequence such as that shown in SEQ ID NO:33 through SEQ ID NO:64. The ability of such nucleic acid probes to specifically hybridize to a polynucleotide encoding a *Staphylococcus epidermidis* polypeptide lends them particular utility in a variety of embodiments. Most importantly, the probes can be used in a variety of assays for detecting the presence of complementary sequences in a given sample.

In certain embodiments, it is advantageous to use oligonucleotide primers. These primers may be generated in any manner, including chemical synthesis, DNA replication, reverse transcription, or a combination thereof. The sequence of such primers is designed using a polynucleotide described herein for use in detecting, amplifying or mutating a defined segment of an ORF polynucleotide that encodes a

Staphylococcus epidermidis polypeptide from prokaryotic cells using polymerase chain reaction (PCR) technology.

In certain embodiments, it is advantageous to employ a polynucleotide described herein in combination with an appropriate label for detecting hybrid
5 formation. A wide variety of appropriate labels are known in the art, including radioactive, enzymatic or other ligands, such as avidin/biotin, which are capable of giving a detectable signal.

Polynucleotides which are identical or sufficiently identical to a nucleotide sequence contained in one of SEQ ID NO:33 through SEQ ID NO:84, or a fragment
10 thereof, may be used as hybridization probes for cDNA and genomic DNA or as primers for a nucleic acid amplification (PCR) reaction, to isolate full-length cDNAs and genomic clones encoding polypeptides described herein and to isolate cDNA and genomic clones of other genes (including genes encoding homologs and
15 orthologs from species other than *Staphylococcus epidermidis*) that have a high sequence similarity to the polynucleotide sequences set forth in of SEQ ID NO:33 through SEQ ID NO:84, or a fragment thereof. Typically these nucleotide sequences are from at least about 70% identical to at least about 95% identical to that of the reference polynucleotide sequence. The probes or primers will generally comprise at
20 least 15 nucleotides, preferably, at least 30 nucleotides and may have at least 50 nucleotides. Particularly preferred probes will have between 30 and 50 nucleotides.

There are several methods available and well known to those skilled in the art to obtain full-length cDNAs, or extend short cDNAs, for example those based on the method of Rapid Amplification of cDNA ends (RACE). See Frohman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8998-9002, 1988. Recent modifications of the technique,
25 exemplified by the Marathon™ technology (Clontech Laboratories Inc.) for example, have significantly simplified the search for longer cDNAs. In the Marathon™ technology, cDNAs have been prepared from mRNA extracted from a chosen tissue and an "adaptor" sequence ligated onto each end. Nucleic acid amplification (PCR) is then carried out to amplify the "missing" 5' end of the cDNA using a combination of
30 gene specific and adaptor specific oligonucleotide primers. The PCR reaction is then repeated using "nested" primers, that is, primers designed to anneal within the

amplified product (typically an adaptor specific primer that anneals further 3' in the adaptor sequence and a gene specific primer that anneals further 5' in the known gene sequence). The products of this reaction can then be analyzed by DNA sequencing and a full-length cDNA constructed either by joining the product directly to the existing cDNA to give a complete sequence, or carrying out a separate full-length PCR using the new sequence information for the design of the 5' primer.

To provide certain of the advantages in accordance with the present invention, a preferred nucleic acid sequence employed for hybridization studies or assays includes probe molecules that are complementary to at least a 10 to about 70 nucleotides long stretch of a polynucleotide that encodes a *Staphylococcus epidermidis* polypeptide, such as that shown in one of SEQ ID NO:33 through SEQ ID NO:84. A size of at least 10 nucleotides in length helps to ensure that the fragment will be of sufficient length to form a duplex molecule that is both stable and selective. Molecules having complementary sequences over stretches greater than 10 bases in length are generally preferred, though, in order to increase stability and selectivity of the hybrid, and thereby improve the quality and degree of specific hybrid molecules obtained. One will generally prefer to design nucleic acid molecules having gene-complementary stretches of 25 to 40 nucleotides, 55 to 70 nucleotides, or even longer where desired. Such fragments can be readily prepared by, for example, directly synthesizing the fragment by chemical means, by application of nucleic acid reproduction technology, such as the PCR technology of (U.S. Patent 4,683,202, incorporated herein after by reference) or by excising selected DNA fragments from recombinant plasmids containing appropriate inserts and suitable restriction enzyme sites.

In another embodiment, it is contemplated that an isolated and purified polynucleotide comprises a nucleotide sequence that is identical or complementary to a segment of at least 10 contiguous bases of one of SEQ ID NO:33 through SEQ ID NO:84, wherein the polynucleotide hybridizes to a polynucleotide that encodes a *Staphylococcus epidermidis* polypeptide. Preferably, the isolated and purified polynucleotide comprises a base sequence that is identical or complementary to a segment of at least 25 to about 70 contiguous bases of one of SEQ ID NO:33 through SEQ ID NO:84. For example, the polynucleotide can comprise a segment of

: > 000037

bases identical or complementary to 40 or 55 contiguous bases of the disclosed nucleotide sequences.

Accordingly, a polynucleotide probe molecule can be used for its ability to selectively form duplex molecules with complementary stretches of the gene.

- 5 Depending on the application envisioned, one will desire to employ varying conditions of hybridization to achieve varying degree of selectivity of the probe toward the target sequence (see Table 1 below). For applications requiring a high degree of selectivity, one will typically desire to employ relatively stringent conditions to form the hybrids. For some applications, for example, where one desires to
- 10 prepare mutants employing a mutant primer strand hybridized to an underlying template or where one seeks to isolate a *Staphylococcus epidermidis* homologous polypeptide coding sequence from other cells, functional equivalents, or the like, less stringent hybridization conditions are typically needed to allow formation of the heteroduplex (see Table 1). Cross-hybridizing species can thereby be readily
- 15 identified as positively hybridizing signals with respect to control hybridizations. Thus, hybridization conditions are readily manipulated, and thus will generally be a method of choice depending on the desired results.

- For some applications, for example, where one desires to prepare mutants employing a mutant primer strand hybridized to an underlying template or where one
- 20 seeks to isolate a homologous polypeptide coding sequence from other cells, functional equivalents, or the like, less stringent hybridization conditions are typically needed to allow formation of the heteroduplex. Cross-hybridizing species are thereby readily identified as positively hybridizing signals with respect to control hybridizations. In any case, it is generally appreciated that conditions can be
- 25 rendered more stringent by the addition of increasing amounts of formamide, which serves to destabilize the hybrid duplex in the same manner as increased temperature. Thus, hybridization conditions are readily manipulated, and thus will generally be a method of choice depending on the desired results.

- Also described herein are polynucleotides capable of hybridizing under
- 30 reduced stringency conditions, more preferably stringent conditions, and most preferably highly stringent conditions, to polynucleotides described hereinafter.

Examples of stringency conditions are shown in Table 1 below: highly stringent conditions are those that are at least as stringent as, for example, conditions A-F; stringent conditions are at least as stringent as, for example, conditions G-L; and reduced stringency conditions are at least as stringent as, for example, conditions M-

5 R.

Table 1
Stringency Conditions

Stringency Condition	Polynucleotide Hybrid	Hybrid Length (bp) ¹	Hybridization Temperature and Buffer ^H	Wash Temperature and Buffer ^H
A	DNA:DNA	> 50	65°C; 1xSSC -or- 42°C; 1xSSC, 50% formamide	65°C; 0.3xSSC
B	DNA:DNA	< 50	T _B ; 1xSSC	T _B ; 1xSSC
C	DNA:RNA	> 50	67°C; 1xSSC -or- 45°C; 1xSSC, 50% formamide	67°C; 0.3xSSC
D	DNA:RNA	< 50	T _D ; 1xSSC	T _D ; 1xSSC
E	RNA:RNA	> 50	70°C; 1xSSC -or- 50°C; 1xSSC, 50% formamide	70°C; 0.3xSSC
F	RNA:RNA	< 50	T _F ; 1xSSC	T _F ; 1xSSC
G	DNA:DNA	> 50	65°C; 4xSSC -or- 42°C; 4xSSC, 50% formamide	65°C; 1xSSC
H	DNA:DNA	< 50	T _H ; 4xSSC	T _H ; 4xSSC
I	DNA:RNA	> 50	67°C; 4xSSC -or- 45°C; 4xSSC, 50% formamide	67°C; 1xSSC
J	DNA:RNA	< 50	T _J ; 4xSSC	T _J ; 4xSSC
K	RNA:RNA	> 50	70°C; 4xSSC -or- 50°C; 4xSSC, 50% formamide	67°C; 1xSSC

L	RNA:RNA	< 50	T _L ; 2xSSC	T _L ; 2xSSC
M	DNA:DNA	> 50	50°C; 4xSSC -or- 40°C; 6xSSC, 50% formamide	50°C; 2xSSC
N	DNA:DNA	< 50	T _N ; 6xSSC	T _N ; 6xSSC
O	DNA:RNA	> 50	55°C; 4xSSC -or- 42°C; 6xSSC, 50% formamide	55°C; 2xSSC
P	DNA:RNA	< 50	T _P ; 6xSSC	T _P ; 6xSSC
Q	RNA:RNA	> 50	60°C; 4xSSC -or- 45°C; 6xSSC, 50% formamide	60°C; 2xSSC
R	RNA:RNA	< 50	T _R ; 4xSSC	T _R ; 4xSSC

(bp): The hybrid length is that anticipated for the hybridized region(s) of the hybridizing polynucleotides. When hybridizing a polynucleotide to a target polynucleotide of unknown sequence, the hybrid length is assumed to be that of the hybridizing polynucleotide. When polynucleotides of known sequence are hybridized, the hybrid length can be determined by aligning the sequences of the polynucleotides and identifying the region or regions of optimal sequence complementarity.

Buffer¹: SSPE (1xSSPE is 0.15M NaCl, 10mM NaH₂PO₄, and 1.25mM EDTA, pH 7.4) can be substituted for SSC (1xSSC is 0.15M NaCl and 15mM sodium citrate) in the hybridization and wash buffers; washes are performed for 15 minutes after hybridization is complete.

T_L through T_R: The hybridization temperature for hybrids anticipated to be less than 50 base pairs in length should be 5-10°C less than the melting temperature (T_m) of the hybrid, where T_m is determined according to the following equations. For hybrids less than 18 base pairs in length, T_m(°C) = 2(# of A + T bases) + 4(# of G + C bases). For hybrids between 18 and 49 base pairs in length, T_m(°C) = 81.5 + 16.6(log₁₀[Na⁺]) + 0.41(%G+C) - (800/N), where N is the number of bases in the hybrid, and [Na⁺] is the concentration of sodium ions in the hybridization buffer ([Na⁺] for 1xSSC = 0.165 M).

Additional examples of stringency conditions for polynucleotide hybridization are provided in Sambrook *et al.*, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, chapters 9 and 11, and Ausubel *et al.*, 1995, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds., John Wiley & Sons, Inc., sections 2.10 and 6.3-6.4, incorporated hereinafter by reference.

B. *Staphylococcus epidermidis* Polypeptides

In particular embodiments, the present invention provides isolated and purified *Staphylococcus epidermidis* polypeptides for use in immunogenic compositions. Preferably, a *Staphylococcus epidermidis* polypeptide used in an immunogenic composition of the invention is a recombinant polypeptide. In certain embodiments, a *Staphylococcus epidermidis* polypeptide comprises the amino acid sequence that has at least 95% identity to the amino acid sequence of one of SEQ ID NO: 1 through SEQ ID NO: 32, a biological equivalent thereof, or a fragment thereof.

A *Staphylococcus epidermidis* polypeptide used in an immunogenic composition of the present invention encompasses a polypeptide that comprises: 1) the amino acid sequence shown in one of SEQ ID NO: 1 through SEQ ID NO: 32; 2) functional and non-functional naturally occurring variants or biological equivalents of *Staphylococcus epidermidis* polypeptides of SEQ ID NO: 1 through SEQ ID NO: 32; 3) recombinantly produced variants or biological equivalents of *Staphylococcus epidermidis* polypeptides of SEQ ID NO: 1 through SEQ ID NO: 32; and 4) polypeptides isolated from organisms other than *Staphylococcus epidermidis* (orthologues of *Staphylococcus epidermidis* polypeptides).

A biological equivalent or variant of such a *Staphylococcus epidermidis* polypeptide encompasses 1) a polypeptide isolated from *Staphylococcus epidermidis*; and 2) a polypeptide that contains substantially homology to a *Staphylococcus epidermidis* polypeptide.

Biological equivalents or variants of *Staphylococcus epidermidis* include both functional and non-functional *Staphylococcus epidermidis* polypeptides. Functional biological equivalents or variants are naturally occurring amino acid sequence variants of a *Staphylococcus epidermidis* polypeptide that maintains the ability to elicit an immunological or antigenic response in a subject. Functional variants will typically contain only conservative substitutions of one or more amino acids of one of SEQ ID NO: 1 through SEQ ID NO: 32, or substitution, deletion or insertion of non-critical residues in non-critical regions of the polypeptide (e.g., not in regions containing antigenic determinants or protective epitopes).

The present invention further provides non-*Staphylococcus epidermidis* orthologues of *Staphylococcus epidermidis* polypeptides. Orthologues of *Staphylococcus epidermidis* polypeptides are polypeptides that are isolated from non-*Staphylococcus epidermidis* organisms and possess antigenic capabilities of the *Staphylococcus epidermidis* polypeptide. Orthologues of a *Staphylococcus epidermidis* polypeptide can readily be identified as comprising an amino acid sequence that is substantially homologous to one of SEQ ID NO: 1 through SEQ ID NO: 32.

Modifications and changes can be made in the structure of a polypeptide of the present invention and still obtain a molecule having *Staphylococcus epidermidis* antigenicity. For example, certain amino acids can be substituted for other amino acids in a sequence without appreciable loss of antigenicity. Because it is the interactive capacity and nature of a polypeptide that defines that polypeptide's biological functional activity, certain amino acid sequence substitutions can be made in a polypeptide sequence (or, of course, its underlying DNA coding sequence) and nevertheless obtain a polypeptide with like properties.

In making such changes, the hydropathic index of amino acids can be considered. The importance of the hydropathic amino acid index in conferring interactive biologic function on a polypeptide is generally understood in the art (Kyte and Doolittle, J Mol Biol, 157: p. 105-132, 1982). It is known that certain amino acids can be substituted for other amino acids having a similar hydropathic index or score and still result in a polypeptide with similar biological activity. Each amino acid has been assigned a hydropathic index on the basis of its hydrophobicity and charge characteristics. Those indices are: isoleucine (+4.5); valine (+4.2); leucine (+3.8); phenylalanine (+2.8); cysteine/cystine (+2.5); methionine (+1.8); alanine (+1.8); glycine (-0.4); threonine (-0.7); serine (-0.8); tryptophan (-0.9); tyrosine (-1.3); proline (-1.6); histidine (-3.2); glutamate (-3.5); glutamine (-3.5); aspartate (-3.5); asparagine (-3.5); lysine (-3.9); and arginine (-4.5).

It is believed that the relative hydropathic character of the amino acid residue determines the secondary and tertiary structure of the resultant polypeptide, which in turn defines the interaction of the polypeptide with other molecules, such as

enzymes, substrates, receptors, antibodies, antigens, and the like. It is known in the art that an amino acid can be substituted by another amino acid having a similar hydrophobic index and still obtain a functionally equivalent polypeptide. In such changes, the substitution of amino acids whose hydrophobic indices are within ± 2 is preferred, those that are within ± 1 are particularly preferred, and those within ± 0.5 are even more particularly preferred.

Substitution of like amino acids can also be made on the basis of hydrophilicity, particularly where the biological functional equivalent polypeptide or peptide thereby created is intended for use in immunological embodiments. U.S. Patent 4,554,101, incorporated hereinafter by reference, states that the greatest local average hydrophilicity of a polypeptide, as governed by the hydrophilicity of its adjacent amino acids, correlates with its immunogenicity and antigenicity, i.e. with a biological property of the polypeptide.

As detailed in U.S. Patent 4,554,101, the following hydrophilicity values have been assigned to amino acid residues: arginine (+3.0); lysine (+3.0); aspartate (+3.0 ± 1); glutamate (+3.0 ± 1); serine (+0.3); asparagine (+0.2); glutamine (+0.2); glycine (0); proline (-0.5 ± 1); threonine (-0.4); alanine (-0.5); histidine (-0.5); cysteine (-1.0); methionine (-1.3); valine (-1.5); leucine (-1.8); isoleucine (-1.8); tyrosine (-2.3); phenylalanine (-2.5); tryptophan (-3.4). It is understood that an amino acid can be substituted for another having a similar hydrophilicity value and still obtain a biologically equivalent, and in particular, an immunologically equivalent polypeptide. In such changes, the substitution of amino acids whose hydrophilicity values are within ± 2 is preferred, those that are within ± 1 are particularly preferred, and those within ± 0.5 are even more particularly preferred.

As outlined above, amino acid substitutions are generally therefore based on the relative similarity of the amino acid side-chain substituents, for example, their hydrophobicity, hydrophilicity, charge, size, and the like. Exemplary substitutions which take various of the foregoing characteristics into consideration are well known to those of skill in the art and include: arginine and lysine; glutamate and aspartate; serine and threonine; glutamine and asparagine; and valine, leucine and isoleucine (See Table 2, below). The present invention thus contemplates immunogenic

compositions comprising functional or biological equivalents of a *Staphylococcus epidermidis* polypeptide as set forth above.

Table 2
Amino Acid Substitutions

Original Residue	Exemplary Residue Substitution
Ala	Gly; Ser
Arg	Lys
Asn	Gln; His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Ala
His	Asn; Gln
Ile	Leu; Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg
Met	Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

- 5 Biological or functional equivalents of a polypeptide can also be prepared using site-specific mutagenesis. Site-specific mutagenesis is a technique useful in the preparation of second generation polypeptides, or biologically functional equivalent polypeptides or peptides, derived from the sequences thereof, through
- 10 specific mutagenesis of the encoding DNA. As noted above, such changes can be desirable where amino acid substitutions are desirable. The technique further provides a ready ability to prepare and test sequence variants, for example, incorporating one or more of the foregoing considerations, by introducing one or more nucleotide sequence changes into the DNA. Site-specific mutagenesis allows
- 15 the production of mutants through the use of specific oligonucleotide sequences which encode the DNA sequence of the desired mutation, as well as a sufficient number of adjacent nucleotides, to provide a primer sequence of sufficient size and sequence complexity to form a stable duplex on both sides of the deletion junction being traversed. Typically, a primer of about 17 to 25 nucleotides in length is

preferred, with about 5 to 10 residues on both sides of the junction of the sequence being altered.

In general, the technique of site-specific mutagenesis is well known in the art. As will be appreciated, the technique typically employs a phage vector which can exist in both a single stranded and double stranded form. Typically, site-directed mutagenesis in accordance herewith is performed by first obtaining a single-stranded vector which includes within its sequence a DNA sequence which encodes all or a portion of the *Staphylococcus epidermidis* polypeptide sequence selected. An oligonucleotide primer bearing the desired mutated sequence is prepared (e.g., synthetically). This primer is then annealed to the single-stranded vector, and extended by the use of enzymes such as *E. coli* polymerase I Klenow fragment, in order to complete the synthesis of the mutation-bearing strand. Thus, a heteroduplex is formed wherein one strand encodes the original non-mutated sequence and the second strand bears the desired mutation. This heteroduplex vector is then used to transform appropriate cells such as *E. coli* cells and clones are selected which include recombinant vectors bearing the mutation. Commercially available kits come with all the reagents necessary, except the oligonucleotide primers.

A *Staphylococcus epidermidis* polypeptide or polypeptide antigen used in an immunogenic composition of the present invention is understood to be any *Staphylococcus epidermidis* polypeptide comprising substantial sequence similarity, structural similarity and/or functional similarity to a *Staphylococcus epidermidis* polypeptide comprising the amino acid sequence of one of SEQ ID NO: 1 through SEQ ID NO: 32. In addition, such a *Staphylococcus epidermidis* polypeptide or polypeptide antigen is not limited to a particular source. Thus, the invention provides for the general detection and isolation of the polypeptides from a variety of sources.

It is contemplated in the present invention, that a *Staphylococcus epidermidis* polypeptide may advantageously be cleaved into fragments for use in further structural or functional analysis, or in the generation of reagents such as *Staphylococcus epidermidis*-related polypeptides and *Staphylococcus epidermidis*-specific antibodies. This can be accomplished by treating purified or unpurified *Staphylococcus epidermidis* polypeptides with a peptidase such as endoprotease

glu-C (Boehringer, Indianapolis, IN). Treatment with CNBr is another method by which peptide fragments may be produced from natural *Staphylococcus epidermidis* polypeptides. Recombinant techniques also can be used to produce specific fragments of a *Staphylococcus epidermidis* polypeptide.

5 Fragments of the *Staphylococcus epidermidis* polypeptides are also included in the immunogenic compositions of the invention. A fragment is a polypeptide having an amino acid sequence that is entirely the same as part, but not all, of the amino acid sequence. The fragment can comprise, for example, at least 7 or more (e.g., 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, or more) contiguous amino acids of an amino acid
10 sequence of one of SEQ ID NO: 1 through SEQ ID NO: 32. Fragments may be "freestanding" or comprised within a larger polypeptide of which they form a part or region, most preferably as a single, continuous region. In one embodiment, the fragments include at least one epitope of the mature polypeptide sequence.

 "Fusion protein" refers to a protein or polypeptide encoded by two, often
15 unrelated, fused genes or fragments thereof. For example, fusion proteins or polypeptides comprising various portions of constant region of immunoglobulin molecules together with another human protein or part thereof have been described. In many cases, employing an immunoglobulin Fc region as a part of a fusion protein or polypeptide is advantageous for use in therapy and diagnosis resulting in, for
20 example, improved pharmacokinetic properties (see e.g., International Application EP-A 0232 2621). On the other hand, for some uses it is desirable to be able to delete the Fc part after the fusion protein or polypeptide has been expressed, detected and purified.

 It is contemplated that *Staphylococcus epidermidis* polypeptides may be
25 isolated from *Staphylococcus epidermidis* or prepared recombinantly as described herein.

C. *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS* POLYNUCLEOTIDE AND POLYPEPTIDE VARIANTS

 "Variant" as the term is used hereinafter, is a polynucleotide or polypeptide that differs from a reference polynucleotide or polypeptide respectively, but retains
30 essential properties. A typical variant of a polynucleotide differs in nucleotide

sequence from another, reference polynucleotide. Changes in the nucleotide sequence of the variant may or may not alter the amino acid sequence of a polypeptide encoded by the reference polynucleotide. Nucleotide changes may result in amino acid substitutions, additions, deletions, fusions and truncations in the polypeptide encoded by the reference sequence, as discussed below. A typical variant of a polypeptide differs in amino acid sequence from another, reference polypeptide. Generally, differences are limited so that the sequences of the reference polypeptide and the variant are closely similar overall and, in many regions, identical. A variant and reference polypeptide may differ in amino acid sequence by one or more substitutions, additions, deletions in any combination. A substituted or inserted amino acid residue may or may not be one encoded by the genetic code. A variant of a polynucleotide or polypeptide may be a naturally occurring such as an allelic variant, or it may be a variant that is not known to occur naturally. Non-naturally occurring variants of polynucleotides and polypeptides may be made by mutagenesis techniques or by direct synthesis.

"Identity," as known in the art, is a relationship between two or more polypeptide sequences or two or more polynucleotide sequences, as determined by comparing the sequences. In the art, "identity" also means the degree of sequence relatedness between polypeptide or polynucleotide sequences, as the case may be, as determined by the match between strings of such sequences. "Identity" and "similarity" can be readily calculated by known methods, including but not limited to those described in (Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; and Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988). Methods to determine identity are designed to give the largest match between the sequences tested. Methods to determine identity and similarity are codified in publicly available computer programs. Computer program methods to determine identity and similarity between two sequences include, but are not limited to, the GCG program package (Devereux *et al.*, *Nucleic Acids Research*

12(1):387, 1984), BLASTP, BLASTN, TBLASTN and FASTA (Altschul *et al.*, *J. Molec. Biol.* 215:403-410, 1990). The BLASTX program is publicly available from NCBI and other sources (BLAST Manual, Altschul, S., *et al.*, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul *et al.*, *J. Molec. Biol.* 215:403-410, 1990.). The well known Smith-Waterman algorithm may also be used to determine identity.

By way of example, a polynucleotide sequence described herein may be identical to the reference sequence of one of SEQ ID NO: 33 through SEQ ID NO: 64, that is be 100% identical, or it may include up to a certain integer number of nucleotide alterations as compared to the reference sequence. Such alterations are selected from the group consisting of at least one nucleotide deletion, substitution, including transition and transversion, or insertion, and wherein said alterations may occur at the 5' or 3' terminal positions of the reference nucleotide sequence or anywhere between those terminal positions, interspersed either individually among the nucleotides in the reference sequence or in one or more contiguous groups within the reference sequence. The number of nucleotide alterations is determined by multiplying the total number of nucleotides in one of SEQ ID NO: 33 through SEQ ID NO: 64 by the numerical percent of the respective percent identity (divided by 100) and subtracting that product from said total number of nucleotides in one of SEQ ID NO: 33 through SEQ ID NO: 64.

For example, an isolated *Staphylococcus epidermidis* polynucleotide comprising a polynucleotide sequence that has at least 70% identity to the nucleic acid sequence of one of SEQ ID NO: 33 through SEQ ID NO: 64; a degenerate variant thereof or a fragment thereof, wherein the polynucleotide sequence may include up to n_a nucleic acid alterations over the entire polynucleotide region of the nucleic acid sequence of one of SEQ ID NO: 33 through SEQ ID NO: 64, wherein n_a is the maximum number of alterations and is calculated by the formula:

$$n_a \leq x_n - (x_n \cdot y),$$

In which x_n is the total number of nucleic acids of one of SEQ ID NO: 33 through SEQ ID NO: 64 and y has a value of 0.70, wherein any non-integer product of x_n and y is rounded down to the nearest integer prior to subtracting such product from x_n . Of course, y may also have a value of 0.80 for 80%, 0.85 for 85%, 0.90 for 90% 0.95 for

95%, etc. Alterations of a polynucleotide sequence encoding one of the polypeptides of SEQ ID NO: 1 through SEQ ID NO: 32 may create nonsense, missense or frameshift mutations in this coding sequence and thereby alter the polypeptide encoded by the polynucleotide following such alterations.

- 5 Similarly, a polypeptide sequence described herein may be identical to the reference sequence of SEQ ID NO: 1 through SEQ ID NO: 32, that is be 100% identical, or it may include up to a certain integer number of amino acid alterations as compared to the reference sequence such that the % identity is less than 100%. Such alterations are selected from the group consisting of at least one amino acid
- 10 deletion, substitution, including conservative and non-conservative substitution, or insertion, and wherein said alterations may occur at the amino- or carboxy-terminal positions of the reference polypeptide sequence or anywhere between those terminal positions, interspersed either individually among the amino acids in the reference sequence or in one or more contiguous groups within the reference sequence. The
- 15 number of amino acid alterations for a given % identity is determined by multiplying the total number of amino acids in one of SEQ ID NO: 1 through SEQ ID NO: 32 by the numerical percent of the respective percent identity (divided by 100) and then subtracting that product from said total number of amino acids in one of SEQ ID NO: 1 through SEQ ID NO: 32, or:

$$20 \quad n_a \leq x_a - (x_a \cdot y),$$

wherein n_a is the number of amino acid alterations, x_a is the total number of amino acids in one of SEQ ID NO: 1 through SEQ ID NO: 32, and y is, for instance 0.70 for 70%, 0.80 for 80%, 0.85 for 85% etc., and wherein any non-integer product of x_a and y is rounded down to the nearest integer prior to subtracting it from x_a .

25 **D. Vectors, Host Cells And Recombinant *Staphylococcus epidermidis* Polypeptides**

- In one embodiment, the present invention provides expression vectors comprising ORF polynucleotides that encode *Staphylococcus epidermidis* polypeptides for use in immunogenic compositions. The *Staphylococcus epidermidis*
- 30 expression vectors comprise ORF polynucleotides that encode *Staphylococcus*

epidermidis polypeptides comprising the amino acid residue sequence of one of SEQ ID NO: 1 through SEQ ID NO: 32. Alternatively, the expression vectors comprise a polynucleotide comprising the nucleotide base sequence of one of SEQ ID NO: 33 through SEQ ID NO: 64. In other embodiments, the expression vectors of the
5 invention comprise a polynucleotide operatively linked to an enhancer-promoter. In still other embodiments, the expression vectors comprise a polynucleotide operatively linked to a prokaryotic promoter. Alternatively, the expression vectors comprise a polynucleotide operatively linked to an enhancer-promoter that is a eukaryotic promoter. The expression vectors further comprise a polyadenylation
10 signal that is positioned 3' of the carboxy-terminal amino acid and within a transcriptional unit of the encoded polypeptide.

Expression of proteins in prokaryotes is most often carried out in *E. coli* with vectors containing constitutive or inducible promoters directing the expression of either fusion or non-fusion proteins. Fusion vectors add a number of amino acids to
15 a protein encoded therein, usually to the amino terminus of the recombinant protein. Such fusion vectors typically serve three purposes: 1) to increase expression of recombinant protein; 2) to increase the solubility of the recombinant protein; and 3) to aid in the purification of the recombinant protein by acting as a ligand in affinity purification. Often, in fusion expression vectors, a proteolytic cleavage site is
20 introduced at the junction of the fusion moiety and the recombinant protein to enable separation of the recombinant protein from the fusion moiety subsequent to purification of the fusion protein. Such enzymes, and their cognate recognition sequences, include Factor Xa, thrombin and enterokinase.

Typical fusion expression vectors include pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith and Johnson, *Gene* 67:31-40, 1988), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) and pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) which fuse glutathione S- transferase (GST), maltose E binding protein, or protein A, respectively, to the target recombinant protein.

In one embodiment, the coding sequence of the *Staphylococcus epidermidis* polynucleotide is cloned into a pGEX expression vector to create a vector encoding a
30 fusion protein comprising, from the N-terminus to the C-terminus, GST-thrombin

non-8

cleavage site-*Staphylococcus epidermidis* polypeptide. The fusion protein can be purified by affinity chromatography using glutathione-agarose resin. Recombinant *Staphylococcus epidermidis* polypeptide unfused to GST can be recovered by cleavage of the fusion protein with thrombin.

- 5 Examples of suitable inducible non-fusion *E. coli* expression vectors include pTrc (Amann *et al.*, *Gene* 69:301-315, 1988), pET 11d (Studier *et al.*, "Gene Expression Technology" *Methods in Enzymology* 185, 60-89, 1990), pBAD and pCIRT7. Target gene expression from the pTrc vector relies on host RNA
- 10 expression from the pET 11d vector relies on transcription from a T7 gnl 0-lac fusion promoter mediated by a coexpressed viral RNA polymerase J7 gnl. This viral polymerase is supplied by host strains BL21 (DE3) or HMS 174(DE3) from a resident prophage harboring a T7 gnl gene under the transcriptional control of the lacUV 5 promoter.
- 15 One strategy to maximize recombinant protein expression in *E. coli* is to express the protein in a host bacterium with an impaired capacity to proteolytically cleave the recombinant protein. Another strategy is to alter the nucleic acid sequence of the nucleic acid to be inserted into an expression vector so that the individual codons for each amino acid are those preferentially utilized in *E. coli*. Such
- 20 alteration of nucleic acid sequences of the invention can be carried out by standard DNA mutagenesis or synthesis techniques.

- In another embodiment, the *Staphylococcus epidermidis* polynucleotide expression vector is a yeast expression vector. Examples of vectors for expression in yeast *S. cerevisiae* include pYepSec I (Baldari, *et al.*, *Embo J*, 6: p. 229-234, 1987),
- 25 pMFa (Kurjan and Herskowitz, *Cell*, p. 933-943, 1982), pJRY86 (Schultz *et al.*, *Gene*, 54: p. 113-123, 1987), and pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA).

- Alternatively, a *Staphylococcus epidermidis* polynucleotide can be expressed in insect cells using, for example, baculovirus expression vectors. Baculovirus vectors available for expression of proteins in cultured insect cells (e.g., Sf 9 cells)
- 30 include the pAc series (Smith *et al.*, *Mol Cell Biol*, 3: p. 2156-2165, 1983) and the pVL series (Lucklow and Summers, *Virology*, 170: p. 31-39, 1989).

In yet another embodiment, a nucleic acid of the invention is expressed in mammalian cells using a mammalian expression vector. Examples of mammalian expression vectors include pCDM8 (Seed, Nature, 329: p. 840, 1987) and pMT2PC (Kaufman *et al.*, EMBO J, 6: p. 187-195, 1987). When used in mammalian cells, the expression vector's control functions are often provided by viral regulatory elements.

As used hereinafter, a promoter is a region of a DNA molecule typically within about 100 nucleotide pairs in front of (upstream of) the point at which transcription begins (*i.e.*, a transcription start site). That region typically contains several types of DNA sequence elements that are located in similar relative positions in different genes. As used hereinafter, the term "promoter" includes what is referred to in the art as an upstream promoter region, a promoter region or a promoter of a generalized eukaryotic RNA Polymerase II transcription unit.

Another type of discrete transcription regulatory sequence element is an enhancer. An enhancer provides specificity of time, location and expression level for a particular encoding region (*e.g.*, gene). A major function of an enhancer is to increase the level of transcription of a coding sequence in a cell that contains one or more transcription factors that bind to that enhancer. Unlike a promoter, an enhancer can function when located at variable distances from transcription start sites so long as a promoter is present.

As used hereinafter, the phrase "enhancer-promoter" means a composite unit that contains both enhancer and promoter elements. An enhancer-promoter is operatively linked to a coding sequence that encodes at least one gene product. As used hereinafter, the phrase "operatively linked" means that an enhancer-promoter is connected to a coding sequence in such a way that the transcription of that coding sequence is controlled and regulated by that enhancer-promoter. Means for operatively linking an enhancer-promoter to a coding sequence are well known in the art. As is also well known in the art, the precise orientation and location relative to a coding sequence whose transcription is controlled, is dependent *inter alia* upon the specific nature of the enhancer-promoter. Thus, a TATA box minimal promoter is typically located from about 25 to about 30 base pairs upstream of a transcription initiation site and an upstream promoter element is typically located from about 100

to about 200 base pairs upstream of a transcription initiation site. In contrast, an enhancer can be located downstream from the initiation site and can be at a considerable distance from that site.

5 An enhancer-promoter used in a vector construct described herein can be any enhancer-promoter that drives expression in a cell to be transfected. By employing an enhancer-promoter with well-known properties, the level and pattern of gene product expression can be optimized.

For example, commonly used promoters are derived from polyoma, Adenovirus 2, cytomegalovirus and Simian Virus 40. For other suitable expression systems for both prokaryotic and eukaryotic cells see chapters 16 and 17 of
10 Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" 2nd, ed, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, incorporated hereinafter by reference.

In another embodiment, the recombinant mammalian expression vector is
15 capable of directing expression of the nucleic acid preferentially in a particular cell type (e.g., tissue-specific regulatory elements are used to express the nucleic acid). Tissue-specific regulatory elements are known in the art. Non-limiting examples of suitable tissue-specific promoters include the albumin promoter (liver-specific; Pinkert *et al.*, *Genes Dev*, 1: p. 268-277, 1987), lymphoid-specific promoters (Calame and
20 Eaton, *Adv Immunol*, 43: p. 235-275, 1988), in particular, promoters of T cell receptors (Winkler and Baltimore, *EMBO J*, 8: p. 729-733, 1989) and immunoglobulins (Banerji *et al.*, *Cell*, 33: p. 729-740, 1983), (Queen and Baltimore, *Cell*, 33: p. 741-748, 1983), neuron-specific promoters (e.g., the neurofilament promoter; Byrne and Ruddle, *PNAS*, 86: p. 5473-5477, 1989), pancreas-specific
25 promoters (Edlund *et al.*, *Science*, 230: p. 912-916, 1985), and mammary gland-specific promoters (e.g., milk whey promoter; U.S. Patent 4,873,316 and International Application EP 284,166). Developmentally-regulated promoters are also encompassed, for example the murine hox promoters (Kessel and Gruss, *Science*,
249: p. 374-379, 1990) and the α -fetoprotein promoter (Campes and Tilghman,
30 *Genes Dev*, 3: p. 537-546, 1989).

Also provided herein is a recombinant expression vector comprising a DNA molecule encoding a *Staphylococcus epidermidis* polypeptide cloned into the expression vector in an antisense orientation. That is, the DNA molecule is operatively linked to a regulatory sequence in a manner which allows for expression
5 (by transcription of the DNA molecule) of an RNA molecule which is antisense to *Staphylococcus epidermidis* mRNA. Regulatory sequences operatively linked to a nucleic acid cloned in the antisense orientation can be chosen which direct the continuous expression of the antisense RNA molecule in a variety of cell types. For instance viral promoters and/or enhancers, or regulatory sequences can be chosen
10 which direct constitutive, tissue specific or cell type specific expression of antisense RNA. The antisense expression vector can be in the form of a recombinant plasmid, phagemid or attenuated virus in which antisense nucleic acids are produced under the control of a high efficiency regulatory region, the activity of which can be determined by the cell type into which the vector is introduced.

15 The recombinant expression vectors described herein may be inserted into any suitable host cell. The terms "host cell" and "recombinant host cell" are used interchangeably hereinafter. It is understood that such terms refer not only to the particular subject cell, but to the progeny or potential progeny of such a cell. Because certain modifications may occur in succeeding generations due to either
20 mutation or environmental influences, such progeny may not, in fact, be identical to the parent cell, but are still included within the scope of the term as used hereinafter. A host cell can be any prokaryotic or eukaryotic cell. For example, a *Staphylococcus epidermidis* polypeptide can be expressed in bacterial cells such as *E. coli*, insect cells (such as Sf9, Sf21), yeast or mammalian cells (such as Chinese hamster ovary
25 cells (CHO), VERO, chick embryo fibroblasts, BHK cells or COS cells). Other suitable host cells are known to those skilled in the art.

Vector DNA is introduced into prokaryotic or eukaryotic cells via conventional transformation, infection or transfection techniques. As used hereinafter, the terms "transformation" and "transfection" are intended to refer to a variety of art-recognized
30 techniques for introducing foreign nucleic acid (e.g., DNA) into a host cell, including calcium phosphate or calcium chloride co-precipitation, DEAE-dextran-mediated transfection, lipofection, ultrasound or electroporation. Suitable methods for

3!

00054

transforming or transfecting host cells can be found in Sambrook, et al. ("Molecular Cloning: A Laboratory Manual" 2nd, ed, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989), and other laboratory manuals.

- 5 A host cell described herein, such as a prokaryotic or eukaryotic host cell in culture, is used to produce (i.e., express) a *Staphylococcus epidermidis* polypeptide. Accordingly, also described herein are methods for producing a *Staphylococcus epidermidis* polypeptide using such host cells. In one embodiment, the method comprises culturing the host cell (into which a recombinant expression vector
- 10 encoding a *Staphylococcus epidermidis* polypeptide has been introduced) in a suitable medium until the *Staphylococcus epidermidis* polypeptide is produced. In another embodiment, the method further comprises isolating the *Staphylococcus epidermidis* polypeptide from the medium or the host cell.

- A coding sequence of an expression vector is operatively linked to a
- 15 transcription termination region. RNA polymerase transcribes an encoding DNA sequence through a site where polyadenylation occurs. Typically, DNA sequences located a few hundred base pairs downstream of the polyadenylation site serve to terminate transcription. Those DNA sequences are referred to hereinafter as transcription-termination regions. Those regions are required for efficient
- 20 polyadenylation of transcribed messenger RNA (mRNA). Transcription-termination regions are well known in the art. Examples of such transcription-termination regions are the polyadenylation signal of SV40 and the protamine gene.

- An expression vector comprises a polynucleotide that encodes a
- 25 *Staphylococcus epidermidis* polypeptide. Such a polypeptide is meant to include a sequence of nucleotide bases encoding a *Staphylococcus epidermidis* polypeptide sufficient in length to distinguish the segment from a polynucleotide segment encoding a non-*Staphylococcus epidermidis* polypeptide. Such a polypeptide can also encode biologically functional polypeptides or peptides which have variant amino acid sequences, such as with changes selected based on considerations such
- 30 as the relative hydropathic score of the amino acids being exchanged. These variant sequences are those isolated from natural sources or induced in the sequences

disclosed hereinafter using a mutagenic procedure such as site-directed mutagenesis.

In certain embodiments, the expression vectors described herein comprise polynucleotides that encode polypeptides comprising the amino acid residue
5 sequence of one of SEQ ID NO: 1 through SEQ ID NO: 32. An expression vector can include a *Staphylococcus epidermidis* polypeptide coding region itself of any of the *Staphylococcus epidermidis* polypeptides noted above or it can contain coding regions bearing selected alterations or modifications in the basic coding region of such a *Staphylococcus epidermidis* polypeptide. Alternatively, such vectors or
10 fragments can encode larger polypeptides or polypeptides which nevertheless include the basic coding region. In any event, it should be appreciated that due to codon redundancy as well as biological functional equivalence, this aspect is not limited to the particular DNA molecules corresponding to the polypeptide sequences noted above.

15 Exemplary vectors include the mammalian expression vectors of the pCMV family including pCMV8b and pCMV8c (Clontech Corp., Emeryville CA). In certain cases, and specifically in the case of these individual mammalian expression vectors, the resulting constructs can require co-transfection with a vector containing a selectable marker such as pSV2neo. Via co-transfection into a dihydrofolate
20 reductase-deficient Chinese hamster ovary cell line, such as DG44, clones expressing *Staphylococcus epidermidis* polypeptides by virtue of DNA incorporated into such expression vectors can be detected.

A DNA molecule can be incorporated into a vector by a number of techniques that are well known in the art. For instance, the vector pUC18 has been
25 demonstrated to be of particular value in cloning and expression of genes. Likewise, the related vectors M13mp18 and M13mp19 can be used in certain embodiments of the invention, in particular, in performing dideoxy sequencing.

An expression vector described herein is useful both as a means for preparing quantities of the *Staphylococcus epidermidis* polypeptide-encoding DNA
30 itself, and as a means for preparing the encoded polypeptide and peptides. It is contemplated that where *Staphylococcus epidermidis* polypeptides are made by

recombinant means, one can employ either prokaryotic or eukaryotic expression vectors as shuttle systems.

In another aspect, the recombinant host cells are prokaryotic host cells. Preferably, the recombinant host cells of the invention are bacterial cells of the DH5 α strain of *Escherichia coli*. In general, prokaryotes are preferred for the initial cloning of DNA sequences and constructing the vectors useful in the invention. For example, *E. coli* K12 strains can be particularly useful. Other microbial strains that can be used include *E. coli* B, and *E. coli* X1976 (ATCC No. 31537). These examples are, of course, intended to be illustrative rather than limiting.

10 The aforementioned strains, as well as *E. coli* W3110 (ATCC No. 273326), *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* Top10, *bacilli* such as *Bacillus subtilis*, or other enterobacteriaceae such as *Salmonella typhimurium* (or other attenuated *Salmonella* strains as described in U.S. Patent 4,837,151) or *Serratia marcesans*, and various *Pseudomonas* species can be used.

15 In general, plasmid vectors containing replicon and control sequences, which are derived from species compatible with the host cell are used in connection with these hosts. The vector ordinarily carries a replication site, as well as marking sequences which are capable of providing phenotypic selection in transformed cells. For example, *E. coli* can be transformed using pBR322, a plasmid derived from an *E. coli* species (Bolivar, *et al.* 1977). pBR322 contains genes for ampicillin and tetracycline resistance and thus provides easy means for identifying transformed cells. The pBR plasmid, or other microbial plasmid or phage must also contain, or be modified to contain, promoters which can be used by the microbial organism for expression of its own polypeptides.

25 Those promoters most commonly used in recombinant DNA construction include the β -lactamase (penicillinase) and lactose promoter systems (Chang, *et al.* 1978; Itakura, *et al.* 1977; Goeddel, *et al.* 1979; Goeddel, *et al.* 1980) and a tryptophan (TRP) promoter system (EP 0036776; Siebrun et al. 1980). While these are the most commonly used, other microbial promoters have been discovered and utilized, and details concerning their nucleotide sequences have been published,

enabling a skilled worker to introduce functional promoters into plasmid vectors (Slebowitz, et al. 1980).

In addition to prokaryotes, eukaryotic microbes such as yeast can also be used. *Saccharomyces cerevisiae* or common baker's yeast is the most commonly
5 used among eukaryotic microorganisms, although a number of other strains are commonly available. For expression in *Saccharomyces*, the plasmid YRp7, for example, is commonly used (Stinchcomb, et al. 1979; Kingsman, et al. 1979; Tschemper, et al. 1980). This plasmid already contains the *trp1* gene which provides a selection marker for a mutant strain of yeast lacking the ability to grow in
10 tryptophan, for example ATCC No. 44078 or PEP4-1 (Jones, 1977). The presence of the *trp1* lesion as a characteristic of the yeast host cell genome then provides an effective environment for detecting transformation by growth in the absence of tryptophan.

Suitable promoter sequences in yeast vectors include the promoters for 3-
15 phosphoglycerate kinase (Hitzeman., et al. 1980) or other glycolytic enzymes (Hess, et al. 1968; Holland, et al. 1978) such as enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, hexokinase, pyruvate decarboxylase, phosphofructokinase, glucose-6-phosphate isomerase, 3-phosphoglycerate mutase, pyruvate kinase, triosephosphate isomerase, phosphoglucose isomerase, and glucokinase. In
20 constructing suitable expression plasmids, the termination sequences associated with these genes are also introduced into the expression vector downstream from the sequences to be expressed to provide polyadenylation of the mRNA and termination. Other promoters, which have the additional advantage of transcription controlled by growth conditions are the promoter region for alcohol dehydrogenase 2,
25 isocytochrome C, acid phosphatase, degradative enzymes associated with nitrogen metabolism, and the aforementioned glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, and enzymes responsible for maltose and galactose utilization. Any plasmid vector containing a yeast-compatible promoter, origin or replication and termination sequences are suitable.

30 In addition to microorganisms, cultures of cells derived from multicellular organisms can also be used as hosts. In principle, any such cell culture is workable,

whether from vertebrate or invertebrate culture. However, interest has been greatest in vertebrate cells, and propagation of vertebrate cells in culture (tissue culture) has become a routine procedure in recent years. Examples of such useful host cell lines are AtT-20, VERO, HeLa, NSO, PER C6, Chinese hamster ovary (CHO) cell lines, and W138, BHK, COSM8, COS-7, 293 and MDCK cell lines. Expression vectors for such cells ordinarily include (if necessary) an origin of replication, a promoter located upstream of the gene to be expressed, along with any necessary ribosome binding sites, RNA splice sites, polyadenylation site, and transcriptional terminator sequences.

- 10 Where expression of recombinant *Staphylococcus epidermidis* polypeptides is desired and a eukaryotic host is contemplated, it is most desirable to employ a vector such as a plasmid that incorporates a eukaryotic origin of replication. Additionally, for the purposes of expression in eukaryotic systems, one desires to position the *Staphylococcus epidermidis* encoding sequence adjacent to and under the control of an effective eukaryotic promoter such as promoters used in combination with Chinese hamster ovary cells. To bring a coding sequence under control of a promoter, whether it is eukaryotic or prokaryotic, the 5' end of the translation initiation region of the proper translational reading frame of the polypeptide must be positioned between about 1 and about 50 nucleotides 3' of or downstream with respect to the promoter chosen. Furthermore, where eukaryotic expression is anticipated, one would typically desire to incorporate into the transcriptional unit a polynucleotide which encodes the *Staphylococcus epidermidis* polypeptide.

- 25 Means of transforming or transfecting cells with exogenous polynucleotide such as DNA molecules are well known in the art and include techniques such as calcium-phosphate- or DEAE-dextran-mediated transfection, protoplast fusion, electroporation, liposome mediated transfection, direct microinjection and adenovirus infection (see e.g., Sambrook, Fritsch and Maniatis, 1989).

- 30 The most widely used method is transfection mediated by either calcium phosphate or DEAE-dextran. Although the mechanism remains obscure, it is believed that the transfected DNA enters the cytoplasm of the cell by endocytosis

and is transported to the nucleus. Depending on the cell type, up to 90% of a population of cultured cells can be transfected at any one time. Because of its high efficiency, transfection mediated by calcium phosphate or DEAE-dextran is the method of choice for experiments that require transient expression of the foreign DNA in large numbers of cells. Calcium phosphate-mediated transfection is also used to establish cell lines that integrate copies of the foreign DNA, which are usually arranged in head-to-tail tandem arrays into the host cell genome.

In the protoplast fusion method, protoplasts derived from bacteria carrying high numbers of copies of a plasmid of interest are mixed directly with cultured mammalian cells. After fusion of the cell membranes (usually with polyethylene glycol), the contents of the bacteria are delivered into the cytoplasm of the mammalian cells and the plasmid DNA is transported to the nucleus. Protoplast fusion is not as efficient as transfection for many of the cell lines that are commonly used for transient expression assays, but it is useful for cell lines in which endocytosis of DNA occurs inefficiently. Protoplast fusion frequently yields multiple copies of the plasmid DNA tandemly integrated into the host chromosome.

The application of brief, high-voltage electric pulses to a variety of mammalian and plant cells leads to the formation of nanometer-sized pores in the plasma membrane. DNA is taken directly into the cell cytoplasm either through these pores or as a consequence of the redistribution of membrane components that accompanies closure of the pores. Electroporation can be extremely efficient and can be used both for transient expression of cloned genes and for establishment of cell lines that carry integrated copies of the gene of interest. Electroporation, in contrast to calcium phosphate-mediated transfection and protoplast fusion, frequently gives rise to cell lines that carry one, or at most a few, integrated copies of the foreign DNA.

Liposome transfection involves encapsulation of DNA and RNA within liposomes, followed by fusion of the liposomes with the cell membrane. The mechanism of how DNA is delivered into the cell is unclear but transfection efficiencies can be as high as 90%.

Direct microinjection of a DNA molecule into nuclei has the advantage of not exposing DNA to cellular compartments such as low-pH endosomes. Microinjection is therefore used primarily as a method to establish lines of cells that carry integrated copies of the DNA of interest.

- 5 The use of adenovirus as a vector for cell transfection is well known in the art. Adenovirus vector-mediated cell transfection has been reported for various cells (Stratford-Perricaudet, *et al.* 1992).

- 10 A transfected cell can be prokaryotic or eukaryotic. Preferably, the host cells of the invention are prokaryotic host cells. Where it is of interest to produce a *Staphylococcus epidermidis* polypeptide, cultured prokaryotic host cells are of particular interest.

- 15 Also contemplated herein is a process or method of preparing *Staphylococcus epidermidis* polypeptides comprising transforming, transfecting or infecting cells with a polynucleotide that encodes a *Staphylococcus epidermidis* polypeptide to produce transformed host cells; and maintaining the transformed host cells under biological conditions sufficient for expression of the polypeptide. In a particular embodiment, the transformed host cells are prokaryotic cells. Alternatively, the host cells are eukaryotic cells. More particularly, the prokaryotic cells are bacterial cells of the DH5- α strain of *Escherichia coli*. Alternatively, the
20 polynucleotide transfected into the transformed cells comprises the nucleic acid sequence of one of SEQ ID NO: 33 through SEQ ID NO: 64. Additionally, transfection is accomplished using an expression vector disclosed above. A host cell used in the process is capable of expressing a functional, recombinant *Staphylococcus epidermidis* polypeptide.

- 25 Following transfection, the cell is maintained under culture conditions for a period of time sufficient for expression of a *Staphylococcus epidermidis* polypeptide. Culture conditions are well known in the art and include ionic composition and concentration, temperature, pH and the like. Typically, transfected cells are maintained under culture conditions in a culture medium. Suitable media for various
30 cell types are well known in the art. In certain embodiments, culture temperature is

from about 20°C to about 50°C, more preferably from about 30°C to about 40°C and, even more preferably about 37°C.

The pH is preferably from about a value of 6.0 to a value of about 8.0, more preferably from about a value of about 6.8 to a value of about 7.8 and, most preferably about 7.4. Osmolality is preferably from about 200 milliosmoles per liter (mosm/L) to about 400 mosm/L and, more preferably from about 290 mosm/L to about 310 mosm/L. Other biological conditions needed for transfection and expression of an encoded protein are well known in the art.

Transfected cells are maintained for a period of time sufficient for expression of a *Staphylococcus epidermidis* polypeptide. A suitable time depends *inter alia* upon the cell type used and is readily determinable by a skilled artisan. Typically, maintenance time is from about 2 to about 14 days.

Recombinant *Staphylococcus epidermidis* polypeptide is recovered or collected either from the transfected cells or the medium in which those cells are cultured. Recovery comprises isolating and purifying the *Staphylococcus epidermidis* polypeptide. Isolation and purification techniques for polypeptides are well known in the art and include such procedures as precipitation, filtration, chromatography, electrophoresis and the like.

E. Immunogenic Compositions

The present invention provides immunogenic compositions comprising one or more *Staphylococcus epidermidis* polypeptides selected as described in the Examples below, and physiologically acceptable carriers. In certain embodiments, the immunogenic compositions comprise one or more *Staphylococcus epidermidis* polypeptides comprising the amino acid residue sequence of one or more of SEQ ID NO: 1 through SEQ ID NO: 32. In other embodiments, the immunogenic compositions of the invention comprise polynucleotides that encode *Staphylococcus epidermidis* polypeptides, and physiologically acceptable carriers. For example, the immunogenic compositions of the present invention comprise *Staphylococcus epidermidis* polypeptides comprising the amino acid sequence of one or more of SEQ ID NO: 1 through SEQ ID NO: 32. Alternatively, the immunogenic compositions

comprise polynucleotides comprising the nucleotide sequence of one or more of SEQ ID NO: 33 through SEQ ID NO: 64.

Various tests are used to assess the *in vitro* immunogenicity of the polypeptides of the invention. For example, an *in vitro* opsonic assay is conducted by incubating together a mixture of *Staphylococcus epidermidis* cells, heat inactivated human serum containing specific antibodies to the polypeptide in question, and an exogenous complement source. Opsonophagocytosis proceeds during incubation of freshly isolated human polymorphonuclear cells (PMN's) and the antibody/complement/ *Staphylococcus* cell mixture. Bacterial cells that are coated with antibody and complement are killed upon opsonophagocytosis. Colony forming units (cfu) of surviving bacteria that escape from opsonophagocytosis are determined by plating the assay mixture. Titers are reported as the reciprocal of the highest dilution that gives $\geq 50\%$ bacterial killing, as determined by comparison to assay controls. Specimens that demonstrate less than 50% killing at the lowest serum dilution tested (1:8), are reported as having an OPA titer of 4. The highest dilution tested is 1:2560. Samples with $\geq 50\%$ killing at the highest dilution are repeated, beginning with a higher initial dilution. The method described above is a modification of Gray's method (Gray, Conjugate Vaccines Supplement, p. 694-697, 1990).

A test serum control, which contains test serum plus bacterial cells and heat inactivated complement, is included for each individual serum. This control is used to assess whether the presence of antibiotics or other serum components are capable of killing the bacterial strain directly (i.e. in the absence of complement or PMN's). A human serum with known opsonic titer is used as a positive human serum control. The opsonic antibody titer for each unknown serum is calculated as the reciprocal of the initial dilution of serum giving 50% cfu reduction compared to the control without serum.

A whole cell ELISA assay is also used to assess *in vitro* immunogenicity and surface exposure of the polypeptide antigen, wherein the bacterial strain of interest (*Staphylococcus epidermidis*) 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 polypeptide antigen, is reactive with a surface exposed epitope of

the polypeptide antigen, it can be detected by standard methods known to one skilled in the art.

Any polypeptide 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 epidermidis* immunogenic composition, the animal is challenged with *Staphylococcus epidermidis* and assayed for resistance to *Staphylococcus epidermidis* infection.

The *Staphylococcus epidermidis* polynucleotides and polypeptides are incorporated into immunogenic compositions suitable for administration to a subject, e.g., a human. Such compositions typically comprise the nucleic acid molecule or protein, together with a pharmaceutically acceptable carrier. As used hereinafter the language "pharmaceutically acceptable carrier" is intended to include any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents, and the like, compatible with pharmaceutical administration. The use of such media and agents for pharmaceutically active substances is well known in the art. Except insofar as any conventional media or agent is incompatible with the active compound, such media can be used in the compositions of the invention. Supplementary active compounds can also be incorporated into the compositions.

An immunogenic composition of the invention is formulated to be compatible with its intended route of administration. Examples of routes of administration include parenteral (e.g., intravenous, intradermal, subcutaneous, intraperitoneal), transmucosal (e.g., oral, rectal, intranasal, vaginal, respiratory) and transdermal (topical). Solutions or suspensions used for parenteral, intradermal, or subcutaneous application can include the following components: a sterile diluent such as water for injection, saline solution, fixed oils, polyethylene glycols, glycerine, propylene glycol or other synthetic solvents; antibacterial agents such as benzyl alcohol or methyl parabens; antioxidants such as ascorbic acid or sodium bisulfite; chelating agents

such as ethylenediaminetetraacetic acid; buffers such as acetates, citrates or phosphates and agents for the adjustment of tonicity such as sodium chloride or dextrose. pH can be adjusted with acids or bases, such as hydrochloric acid or sodium hydroxide. The parenteral preparation can be enclosed in ampoules, disposable syringes or multiple dose vials made of glass or plastic.

Pharmaceutical compositions suitable for injectable use include sterile aqueous solutions (where water soluble) or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersion. For intravenous administration, suitable carriers include physiological saline, bacteriostatic water, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) or phosphate buffered saline (PBS). In all cases, the composition must be sterile and should be fluid to the extent that easy syringability exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms such as bacteria and fungi. The carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), and suitable mixtures thereof. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. Prevention of the action of microorganisms can be achieved by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, ascorbic acid, and the like. In many cases, isotonic agents are included, for example, sugars, polyalcohols such as mannitol, sorbitol, sodium chloride in the composition. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by including in the composition an agent which delays absorption, for example, aluminum monostearate and gelatin.

Sterile injectable solutions can be prepared by incorporating the active compound (e.g., a *Staphylococcus epidermidis* polypeptide or anti-*Staphylococcus epidermidis* antibody) in the required amount in an appropriate solvent with one or a combination of ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the active compound into a sterile vehicle that contains a basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile

powders for the preparation of sterile injectable solutions, the preferred methods of preparation are vacuum drying and freeze-drying which yields a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof.

- 5 Oral compositions generally include an inert diluent or an edible carrier. They can be enclosed in gelatin capsules or compressed into tablets. For the purpose of oral therapeutic administration, the active compound can be incorporated with excipients and used in the form of tablets, troches, or capsules. Oral compositions can also be prepared using a fluid carrier for use as a mouthwash, wherein the
- 10 compound in the fluid carrier is applied orally and swished and expectorated or swallowed. Pharmaceutically compatible binding agents, and/or adjuvant materials can be included as part of the composition. The tablets, pills, capsules, troches and the like can contain any of the following ingredients, or compounds of a similar nature: a binder such as microcrystalline cellulose, gum tragacanth or gelatin; an
- 15 excipient such as starch or lactose, a disintegrating agent such as alginic acid, Primogel, or corn starch; a lubricant such as magnesium stearate or Sterotac; a glidant such as colloidal silicon dioxide; a sweetening agent such as sucrose or saccharin; or a flavoring agent such as peppermint, methyl salicylate, or orange flavoring.
- 20 For administration by inhalation, the compounds are delivered in the form of an aerosol spray from pressured container or dispenser which contains a suitable propellant, e.g., a gas such as carbon dioxide, or a nebulizer. Systemic
- 25 administration can also be by transmucosal or transdermal means. For transmucosal or transdermal administration, penetrants appropriate to the barrier to be permeated are used in the formulation. Such penetrants are generally known in the art, and include, for example, for transmucosal administration, detergents, bile salts, and fatty acid derivatives. Transmucosal administration can be accomplished through the use of nasal sprays or suppositories. For transdermal administration, the active compounds are formulated into ointments, salves, gels, or creams as generally
- 30 known in the art.

The compounds can also be prepared in the form of suppositories (e.g., with conventional suppository bases such as cocoa butter and other glycerides) or retention enemas for rectal delivery.

5 In one embodiment, the active compounds are prepared with carriers that will protect the compound against rapid elimination from the body, such as a controlled release formulation, including implants and microencapsulated delivery systems.

10 Biodegradable, biocompatible polymers can be used, such as ethylene vinyl acetate, polyanhydrides, polyglycolic acid, collagen, polyorthoesters, and polylactic acid. Methods for preparation of such formulations will be apparent to those skilled in the art. The materials can also be obtained commercially from Alza Corporation and Nova Pharmaceuticals, Inc. Liposomal suspensions (including liposomes targeted to infected cells with monoclonal antibodies to viral antigens) can also be used as pharmaceutically acceptable carriers. These can be prepared according to methods known to those skilled in the art, for example, as described in U.S. Patent 4,522,811, 15 which is incorporated hereinafter by reference.

20 It is especially advantageous to formulate oral or parenteral compositions in dosage unit form for ease of administration and uniformity of dosage. Dosage unit form as used hereinafter refers to physically discrete units suited as unitary dosages for the subject to be treated; each unit containing a predetermined quantity of active compound calculated to produce the desired therapeutic effect in association with the required pharmaceutical carrier. The specification for the dosage unit forms of the invention are dictated by and directly dependent on the unique characteristics of the active compound and the particular therapeutic effect to be achieved, and the limitations inherent in the art of compounding such an active compound for the 25 treatment of individuals.

Combination immunogenic compositions are provided by including two or more of the polypeptides of the invention, as well as by combining one or more of the polypeptides of the invention with one or more known non-*Staphylococcus epidermidis* polypeptides such as *Staphylococcus aureus* polypeptides.

The following twelve *Staphylococcus epidermidis* polypeptide sequences
 SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14,
 SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 28,
 SEQ ID NO: 27, and SEQ ID NO: 30 have polypeptide sequences with at least 90%
 5 identity to the homologs from *Staphylococcus aureus*. Therefore, these twelve
 polypeptides may also be used in immunogenic compositions against
Staphylococcus aureus. In addition, the following twelve *Staphylococcus epidermidis*
 polynucleotide sequences encoding the the polypeptides with at least 90% identity to
 the *Staphylococcus aureus* homologs may also be used in immunogenic
 10 compositions: SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44,
 SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 55,
 SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, and SEQ ID NO: 62, or a degenerate variant
 thereof, or a fragment thereof.

In other embodiments, combination immunogenic compositions are provided
 15 by combining one or more of the polypeptides of the invention with one or more
 known *S. epidermidis* polysaccharides or polysaccharide-protein conjugates. See,
 for example, the *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* capsular
 polysaccharide adhesin, PNSG, poly-N-succinyl beta-1-6 N-acetyl glucosamine (also
 known as PIA, PSA, PNAG). See Mckenney, D., et al., *Infect. Immun.* 68:4711
 20 (1998) and Mckenney, D., et al., *Science* 284:1523 (1998), the disclosures of which
 are hereby incorporated by reference in their entirety.

In other embodiments, combination immunogenic compositions are provided
 by combining one or more polypeptides of the invention with one or more known *S.*
aureus polysaccharides or *S. aureus* polysaccharide-protein conjugates. For
 25 example, of the 12 known capsular serotypes of *S. aureus*, serotype 5 (CP5) and
 serotype 8 (CP8) account for approximately 85-90% of all clinical isolates []. Most
 methicillin-resistant *S. aureus* isolates express CP5]. Antibodies to CP5 and CP8
 induce type-specific opsonophagocytic killing by human polymorphonuclear
 neutrophils *in vitro* and confer protection in animals [Karakawa, W. W., Sutton, A., et
 30 al., *Infect Immun* 58(5):1090-1095 (1990); Fattom, A. I., Sarwar, J., et al., *Infection &*
Immunity 64(5):1659-1665 (1996)]. Several laboratories have synthesized
 immunogenic conjugates consisting of CP5 and CP8 covalently linked to protein.

... nnnn8

- These conjugates are highly immunogenic in mice and humans and induce antibodies that opsonize microencapsulated *S. aureus* for phagocytosis [Fattom, A., Schneerson, R, et al., *Infect Immun* 61(3):1023-1032 (1993); Gilbert, F. B., Poutrel, B., et al., *Vaccine* 12(4):369-374 (1994); Reynaud-Rondier, L., Volland, A., et al., FEMS Microbiol Immunol 3(4):193-199 (1991)]. Monovalent immunogenic compositions containing CP5 conjugated to *Pseudomonas aeruginosa* recombinant exotoxin A are immunogenic and well tolerated in healthy adults and in patients with end-stage renal disease [Welch, P. G., Fattom, A., Moore, J. Jr., et al., *J. Am. Soc. Nephrol.* 7:247-253 [Abstract] (1996)]. In a double-blind trial involving patients with end-stage renal disease who were receiving hemodialysis, a bivalent conjugate vaccine composed of CP5 and CP8 covalently bound to *Pseudomonas aeruginosa* recombinant exotoxin A conferred partial immunity against *S. aureus* bacteremia for approximately 40 weeks, after which protection decreased as antibody levels decreased [Shinefield, H., Black, S., et al., *N Engl J Med* 346(7):491-498 (2002)].
- The outcome of this trial indicates a need for an improved immunogenic composition that could contribute to broader and more complete protection.

- As described above, in certain embodiments, combination immunogenic compositions are provided by combining one or more polypeptides of the invention with one or more known *S. aureus* polysaccharide-protein conjugates. The "protein component" of the carbohydrate-protein conjugates is known as a carrier protein. The term "carrier proteins", as a group are preferably proteins that are non-toxic and non-reactogenic and obtainable in sufficient amount and purity. Carrier proteins should be amenable to standard conjugation procedures. In a particular embodiment of the present invention, CRM₁₉₇ is used as the carrier protein. CRM₁₉₇ (Wyeth, Sanford, NC) is a non-toxic variant (i.e., toxoid) of diphtheria toxin isolated from cultures of *Corynebacterium diphtheriae* strain C7 (β197) grown in caseamino acids and yeast extract-based medium. CRM₁₉₇ is purified through ultra-filtration, ammonium sulfate precipitation, and ion-exchange chromatography. Other diphtheria toxoids are also suitable for use as carrier proteins. The immunogenic composition may further comprise an adjuvant, such as an aluminum-based adjuvant, such as aluminum phosphate, aluminum sulfate and aluminum hydroxide.

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 [38]), *E. coli* LT, *E. coli* ST, and exotoxin A from *Pseudomonas aeruginosa*. Bacterial outer membrane proteins such as outer
5 membrane complex c (OMPC), porins, transferrin binding proteins, pneumolysin, pneumococcal surface protein A (PspA), pneumococcal adhesin protein (PsaA), 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.

10 Immunogenic compositions comprising polynucleotides are delivered to the recipient by a variety of vectors and expression systems. Such systems include, among others, chromosomal, episomal and virus-derived systems, e.g., vectors derived from bacterial plasmids, attenuated bacteria such as *Salmonella* (U.S. Patent 4,837,151), from bacteriophage, from transposons, from yeast episomes, from
15 insertion elements, from yeast chromosomal elements, from viruses such as vaccinia and other poxviruses, adenovirus, baculoviruses, papova viruses, such as SV40, fowl pox viruses, pseudorabies viruses and retroviruses, alphaviruses such as Venezuelan equine encephalitis virus (U.S. Patent 5,643,576), Sindbis virus and semliki forest virus, nonsegmented negative-stranded RNA viruses such as vesicular stomatitis virus (U.S. Patent 6,168,943), and vectors derived from combinations
20 thereof, such as those derived from plasmid and bacteriophage genetic elements, such as cosmids and phagemids. The expression systems should include control regions that regulate as well as engender expression, such as promoters and other regulatory elements (such as a polyadenylation signal). Generally, any system or
25 vector suitable to maintain, propagate or express polynucleotides to produce a polypeptide in a host may be used. The appropriate nucleotide sequence may be inserted into an expression system by any of a variety of well-known and routine techniques, such as, for example, those set forth in Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" 2nd, ed, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring
30 Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

A pharmaceutically acceptable vehicle is understood to designate a compound or a combination of compounds entering into a pharmaceutical or immunogenic composition which does not cause side effects and which makes it

45

nnn20

possible, for example, to facilitate the administration of the active compound, to increase its life and/or its efficacy in the body, to increase its solubility in solution or alternatively to enhance its preservation. These pharmaceutically acceptable vehicles are well known and will be adapted by persons skilled in the art according to the nature and the mode of administration of the active compound chosen.

As defined hereinafter, an "adjuvant" is a substance that serves to enhance the immunogenicity of an "antigen" or the immunogenic compositions comprising one or more polypeptide antigens having an amino acid sequence chosen from one of SEQ ID NO: 1 through SEQ ID NO: 32. Thus, adjuvants are often given to boost or modulate the immune response and are well known to the skilled artisan. Examples of adjuvants contemplated in the present invention include, but are not limited to, aluminum salts (alum) such as aluminum phosphate and aluminum hydroxide, *Mycobacterium tuberculosis*, bacterial lipopolysaccharides, 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 Number 5,113,918; one such AGP is 2-[(R)-3-Tetradecanoyloxytetradecanoylamino]ethyl 2-Deoxy-4-O-phosphono-3-O-[(R)-3-tetradecanoyloxytetradecanoyl]-2-[(R)-3-tetradecanoyloxytetradecanoylamino]- β -D-glucopyranoside, which is also known as 529 (formerly known as RC529), which is formulated as an aqueous form or as a stable emulsion, MPL™ (3-O-deacylated monophosphoryl lipid A) (Corixa) described in U.S. Patent Number 4,912,094, synthetic polynucleotides such as oligonucleotides containing a CpG motif (U.S. Patent Number 5,207,646), polypeptides, saponins such as Quil A or STIMULON™ QS-21 (Antigenics, Framingham, Massachusetts), described in U.S. Patent Number 5,057,540, a pertussis toxin (PT), or an E. coli heat-labile toxin (LT), particularly LT-K83, LT-R72, CT-S109, PT-K9/G129; see, e.g., International Patent Publication Nos. WO 93/13302 and WO 92/19295, cholera toxin (either in a wild-type or mutant form, e.g., wherein the glutamic acid at amino acid position 29 is replaced by another amino acid, preferably a histidine, in accordance with published International Patent Application number WO 00/18434). Similar cholera toxin mutants are described in published International Patent Application number WO 02/098368 (wherein the isoleucine at amino acid position 16 is replaced by another amino acid, either alone or in combination with the replacement of the serine at amino acid position 66 by

another amino acid; and/or wherein the valine at amino acid position 72 is replaced by another amino acid). Other cholera toxin mutants are described in published International Patent Application number WO 02/098369 (wherein the arginine at amino acid position 25 is replaced by another amino acid; and/or an amino acid is
5 inserted at amino acid position 49; and/or two amino acids are inserted at amino acid positions 35 and 36).

Various cytokines and lymphokines are suitable for use as adjuvants. One such adjuvant is granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), which has a nucleotide sequence as described in U.S. Patent Number 5,078,998. A
10 plasmid containing GM-CSF cDNA has been transformed into *E. coli* and has been deposited with the American Type Culture Collection (ATCC), 1081 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, under Accession Number 39900. The cytokine Interleukin-12 (IL-12) is another adjuvant which is described in U.S. Patent Number 5,723,127. Other cytokines or lymphokines have been shown to have
15 immune modulating activity, including, but not limited to, the Interleukins 1-alpha, 1-beta, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 14, 15, 16, 17 and 18, the Interferons-alpha, beta and gamma, granulocyte colony stimulating factor, and the tumor necrosis factors alpha and beta, and are suitable for use as adjuvants.

A composition of the present invention is typically administered parenterally in
20 unit dosage formulations containing standard, well-known nontoxic physiologically acceptable carriers, adjuvants, and vehicles as desired.

Injectable preparations, for example sterile injectable aqueous or oleaginous suspensions, are formulated according to the known art using suitable dispersing or wetting agents and suspending agents. The sterile injectable preparation can also
25 be a sterile injectable solution or suspension in a nontoxic parenterally acceptable diluent or solvent, for example, as a solution in 1,3-butanediol.

Among the acceptable vehicles and solvents that may be employed are water, Ringer's solution, and isotonic sodium chloride solution. In addition, sterile, fixed oils are conventionally employed as a solvent or suspending medium. For this
30 purpose any bland fixed oil can be employed including synthetic mono- or di-

nnn22

glycerides. In addition, fatty acids such as oleic acid find use in the preparation of injectables.

Preferred carriers include neutral saline solutions buffered with phosphate, lactate, Tris, and the like. Of course, when administering viral vectors, one purifies the vector sufficiently to render it essentially free of undesirable contaminants, such as defective interfering adenovirus particles or endotoxins and other pyrogens such that it does not cause any untoward reactions in the individual receiving the vector construct. A preferred means of purifying the vector involves the use of buoyant density gradients, such as cesium chloride gradient centrifugation.

10 A carrier can also be a liposome. Means for using liposomes as delivery vehicles are well known in the art (see, e.g. Gabizon *et al.*, 1990; Ferruti *et al.*, 1988; and Ranade, 1989).

The immunogenic compositions of this invention also comprise a polynucleotide sequence of this invention operatively associated with a regulatory sequence that controls gene expression. The polynucleotide sequence of interest is engineered into an expression vector, such as a plasmid, under the control of regulatory elements which will promote expression of the DNA, that is, promoter and/or enhancer elements. In a preferred embodiment, the human cytomegalovirus immediate-early promoter/enhancer is used (U.S. Patent 5,168,062). The promoter may be cell-specific and permit substantial transcription of the polynucleotide only in predetermined cells.

The polynucleotides of the invention are introduced directly into the host either as "naked" DNA (U.S. Patent 5,580,859) or formulated in compositions with facilitating agents, such as bupivacaine and other local anesthetics (U.S. Patent 5,593,972) and cationic polyamines (U.S. Patent 6,127,170), which are hereby incorporated by reference in their entirety.

In this polynucleotide immunization procedure, the polypeptides of the invention are expressed on a transient basis *in vivo*; no genetic material is inserted or integrated into the chromosomes of the host. This procedure is to be distinguished from gene therapy, where the goal is to insert or integrate the genetic material of

interest into the chromosome. An assay is used to confirm that the polynucleotides administered by immunization do not give rise to a transformed phenotype in the host (U.S. Patent 6,168,918).

H. Uses and Methods of the Invention

5 The *Staphylococcus epidermidis* polynucleotides, polypeptides and polypeptide homologues described herein are used in methods of immunization. The isolated polynucleotides are used to express *Staphylococcus epidermidis* polypeptides (e.g., via a recombinant expression vector in a host cell or in polynucleotide immunization applications).

10 As described in detail in the Examples herein, *Staphylococcus epidermidis* was grown in the presence of serum to stimulate the expression of proteins and carbohydrates at the bacterial cell wall that may be significant to systemic bacterial infection. As a result, thirty two polypeptides and the corresponding polynucleotides were identified as expressed by *Staphylococcus epidermidis* when grown in 70%
15 serum. In addition, twenty-four of these proteins were found to be reactive with immune sera from rabbits infected with *Staphylococcus epidermidis*.

 The genes corresponding to the proteins expressed when *Staphylococcus epidermidis* was grown in serum were cloned and used to express the proteins recombinantly. The recombinant proteins were used to immunize mice and twenty
20 five of twenty six proteins induced antibodies that reacted with whole cell lysates of *Staphylococcus epidermidis*. In addition, eighteen of these sera also reacted with whole cell lysates of *Staphylococcus aureus*. Finally, when immunized mice were challenged with *Staphylococcus epidermidis* it was found that eleven of the proteins had induced antibodies that reduced the amount of detectable bacteria found in the
25 spleen after challenge.

 The invention further provides immunogenic compositions comprising one or more polypeptides just described, which have an amino acid sequence chosen from one SEQ ID NO: 1 through SEQ ID NO: 32, a biological equivalent thereof or a fragment thereof. The immunogenic composition may further comprise a

47

nnn76

pharmaceutically acceptable carrier. In certain embodiments, the immunogenic composition will comprise one or more adjuvants.

In another embodiment, the invention provides immunogenic compositions comprising a polynucleotide having a nucleotide sequence chosen from one of SEQ ID NO: 33 through SEQ ID NO: 64, wherein the polynucleotide is comprised in a recombinant expression vector. Preferably the vector is plasmid DNA. The polynucleotide may further comprise heterologous nucleotides, e.g., the polynucleotide is operatively linked to one or more gene expression regulatory elements, and further comprise one or more adjuvants. In a preferred embodiment, the immunogenic polynucleotide composition directs the expression of one or more neutralizing epitopes of *Staphylococcus epidermidis*.

Provided also are methods for immunizing a host against *Staphylococcus epidermidis* infection. In a preferred embodiment, the host is human. Thus, a host or subject is administered an immunizing amount of an immunogenic composition comprising a polypeptide having an amino acid sequence chosen from one of SEQ ID NO: 1 through SEQ ID NO: 32, a biological equivalent thereof or a fragment thereof and a pharmaceutically acceptable carrier. An immunizing amount of an immunogenic composition is determined by performing 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 are inferred from immunization data in animal models. The dosage amount can vary depending upon specific conditions of the individual. The amount is determined in routine trials by means known to those skilled in the art.

An immunologically effective amount of the immunogenic composition in an appropriate number of doses is administered to the subject to elicit an immune response. Immunologically effective amount, as used herein, means the administration of that amount to a mammalian host (preferably human), either in a single dose or as part of a series of doses, sufficient to at least cause the immune system of the individual treated to generate a response that reduces the clinical impact of the bacterial infection. Ideally, the treated individual will not exhibit the more serious clinical manifestations of the *Staphylococcal epidermidis* or *Staphylococcal*

severe 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.

5 All patents and publications cited herein are hereby incorporated by reference.

EXAMPLES

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. All chemicals were obtained from Sigma (Sigma Chemical Co.,
10 St. Louis, MO) unless stated otherwise. The following examples are presented for illustrative purpose, and should not be construed in any way limiting the scope of this invention.

Example 1

Bacterial Growth in 70% Serum

15 The following examples were performed using the clinical isolate *Staphylococcus epidermidis* 0-47. The unannotated genomic sequence was available for this isolate from Incyte Corporation of Palo Alto, CA. See Hellmann, C., et al., Infect Immun, 64(1): p. 277-82 (1996). To stimulate the expression of proteins, which may be clinically relevant to pathogenicity, cultures of bacteria were grown overnight
20 in either 100% tryptic soy broth (TSB) or 70: 30 rabbit serum:TSB with shaking (200 rpm) at 37°C. The rabbit serum was obtained from Life Technologies, Rockville, MD. Bacteria were diluted from an overnight culture to an OD₆₀₀ ~ 0.1 and grown for 4h until mid log phase. At mid log phase, the cells were harvested by centrifugation and further processed as described in the following examples.

25

Example 2

Preparation Of Cell Wall Fractions For 2-D Gel Electrophoresis

The cell walls of *Staphylococcus epidermidis* 0-47 grown as described in Example 1 were isolated and then prepared for two-dimensional gel electrophoresis. Bacterial pellets were resuspended to an OD₆₀₀ ~ 20 and washed twice with rocking

48

non 75

for 15 minutes at 4°C using Tris buffered saline (TBS, 20 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl). Serum proteins bound to the surface of the bacteria were removed by washing for 15 minutes at 4°C with 20 mM Tris, pH 8.0 containing 1M NaCl. Bacteria grown in TSB were treated in the same manner as the bacteria grown in serum. The bacteria were again pelleted by centrifugation. To create protoplasts, the bacteria were then resuspended to OD₆₀₀ ~ 40 in TBS containing 30% sucrose, 100 µg/ml lysoestaphin, 10 µg /ml DNase, 1 µg /ml Pefablock (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), 10 µg /ml lysozyme and 100 units/ml mutanolysin and incubated at 37°C for 1 hour. The resulting protoplasts were pelleted by centrifugation at 5000 rpm for 10 minutes and the supernatant containing the cell wall material was decanted. The decanted supernatants containing the cell wall fractions were supplemented with Complete Mini protease inhibitor tablets (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) and dialyzed overnight against water at 4°C using a 10,000 kD MWCO dialysis membrane (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL). After dialysis, the cell wall fractions were frozen at -20°C.

Following isolation, the cell wall fraction samples were prepared for 2-D gel electrophoresis as follows: the frozen cell wall extracts were thawed and precipitated with 70% acetone on ice for 4 hours. The protein precipitate was pelleted, dried in a SpeedVac (Thermo Savant, Holbrook, NY) and solubilized with ReadyPrep (BioRad) SEQUENTIAL EXTRACTION REAGENT 3, which contains 5 M urea, 2 M thiourea, 2% (w/v) CHAPS, 2% (w/v) SB 3-10, 40 mM Tris and 0.2% Bio-Lyte 3/10.

The prepared cell wall fraction samples were loaded onto 11 cm immobilized pH gradient (IPG) strips, pH 4-7 (BioRad) by allowing each sample to re-hydrate a gel strip during an overnight incubation at room temperature. The sample size was 250 µg in a total volume of 200 µl. During the overnight incubation, the strips were covered with mineral oil (BioRad) to prevent evaporation. Following completion of rehydration of the strips, excess mineral oil was removed onto blotting paper that was saturated with water and the hydrated strips were then loaded into a pHaser Iso-electric focusing (IEF) apparatus (Genomic Solutions Inc., Ann Arbor, MI). The strips were prefocused with a current limit of 50 mA/strip with the voltage gradually increasing from 250 V to 5,000 V. Voltage was then held constant at 5,000 V for a total 50 kWh (~16h). Second dimension SDS-PAGE was carried out using 12.5%

Criterion precast gels (BioRad). For mass spectrometric analysis, gels were stained with Sypro Ruby protein gel stain (BioRad) according to the manufacturer's instructions.

Two-dimensional (2D) gel profiles of cell wall associated proteins from *Staphylococcus epidermidis* grown in TSB or 70% rabbit serum were compared. See Figure 1. Growth in 70% rabbit serum resulted in a change in the protein expression profile of cell wall associated proteins from *Staphylococcus epidermidis* that was easily detectable in fluorescent stained transfers of 2D gels (Figures 1A and 1B).

Eight proteins were detected by fluorescent stain to be differentially regulated between *Staphylococcus epidermidis* grown in TSB or in the presence of rabbit serum. See Table 3 and Figure 1. Most notable was an increase in the fluorescent staining of three protein streaks between 25 kDa and 37 kDa in the cells grown in 70% serum (Figure 1B, spots e, g and h).

Table 3
List of Spots Identified^a

^b Spot #	Protein SEQ ID NO:	^c Method of detection
1,2	12	1,S
3	12	1,S
3	19	1,S
4 ^a	11	1,S
4	18	1,S
6-7, 9	11	1,S
8	21	1
10 ^c	11	1,S
10	18	1,S
10	28	1,S
11	3	1,S
12	10	1,S
13	10	1,S
13	28	1,S
14	^d NGID	1,S
15-16	10	1,S

49

non 78

17	25	I
18	4	I
19	17	I,S
19	23	I,S
20-23, 25	17	I,S
24	30	I,S
26	30	I,S
26	8	I,S
26	7	I,S
27, 30-32	2	I,S
28, 33	22	I,S
29	5	I,S
34	13	I,S
35	NGID	I
36	NGID	I
37	NGID	I,S
38	29	I,S
38	3	I,S
39	32	I,S
40	14	S
40	20	S
40	27	S
41	14	S
42	6	I
43	32	S
43	16	S
43	24	S
44	15	S

*List of spots detected on 2D blots by reactivity with immune sera or binding to serum components.

*Some spots contained more than one protein.

*Method by which the spot was detected following transfer to nitrocellulose, reactive immune sera from infected rabbits, I, or binding serum components, S.

*NGID = no gene in database

Example 3**Binding of Immune Serum and Biotinylated Serum Proteins to Cell Wall Proteins**

After completion of the first and second dimensions of electrophoresis, the protein content of the gels was transferred onto nitrocellulose for binding assays. Specifically, the protein content of the gels was electro-blotted to nitrocellulose membranes (BioRad) using a semi-dry blotting apparatus (Owl Separations Systems, Portsmouth, NH) at 12V for 1 hour. The protein containing nitrocellulose membranes (blots) were then stained with Sypro Ruby protein blot stain (BioRad) following the manufacturer's instructions and visualized in a FluorS Imager (BioRad). Each blot was incubated in blocking buffer (PBS with 0.05% Tween 20 and 5% dry milk) for 10 minutes at room temperature then incubated overnight with either a 1:2000 dilution of immune sera (Western blot) or 40 µg/ml biotinylated serum proteins (see below). Following overnight incubation, blots were washed 3x with wash buffer (PBS with 0.5% Tween 20) and incubated with either goat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate (Biosource International, Camarillo, CA) or streptavidin alkaline phosphatase conjugate (Biosource) for 2 hours at room temperature in blocking buffer. Blots were again washed three times with wash buffer and visualized with BCIP/NBT membrane phosphatase substrate system (KPL, Inc., Gaithersburg, MD). Pictures were taken in the FluorS. All analysis of 2D gels was performed using Melanie 3.0 software.

Protein concentration was assayed using the BioRad protein assay kit (BioRad).

Changes in the protein expression profile of cell wall associated proteins was more pronounced by considering the Western blots of the nitrocellulose membranes containing the proteins transferred from the 2D gels. In the Western blots, the nitrocellulose membranes were incubated with pooled immune sera from rabbits repeatedly infected with *Staphylococcus epidermidis* 0-47. See Figures 1C and 1D. These upregulated proteins are also strongly immunoreactive, suggesting they were expressed during infection of the rabbits. Five other immunoreactive streaks or spots from the serum-grown cells were expressed at either lower or undetectable levels in TSB grown cells. See Figure 1, spots a, b, c, d and f.

Example 4**Analysis of Serum Proteins that Interact With *Staphylococcus epidermidis* Cell Wall Associated Proteins****Elution of serum proteins from *Staphylococcus epidermidis***

- 5 *Staphylococcus epidermidis* 0-47 was grown in 70% rabbit serum at 37°C to OD₆₀₀~0.8 and the cells were pelleted. The cells were resuspended at OD₆₀₀~20 and washed three times with TBS while rocking at 4°C. The bound serum proteins were eluted sequentially with 20 mM Tris, pH 8.0 containing either 0.5 M NaCl, 1.0 M NaCl or 4.0 M urea for 1 hour with rocking at 4°C. The bacteria were then removed
- 10 by centrifugation and the supernatant collected. The supernatants contained the serum proteins eluted from the surface of the bacteria. Proteins eluted under the different conditions were analyzed by SDS-PAGE using 4-20% gradient Tris-glycine gels (Cambrex BioSciences Rockland, Inc., Rockland, ME)

Blotinylation of serum proteins

- 15 The eluted serum proteins were dialyzed overnight against PBS at 4°C. IgG's were depleted by overnight incubation with protein G sepharose (Amersham-Pharmacia, Piscataway, NJ) at 4°C. Assuming an average protein mass of 50 kDa in the eluted fraction, the proteins were labeled with a 15-molar excess of EZ-Link® NHS-biotin (Pierce Biotechnology) for 1.5 hour at 4°C. The reaction was quenched
- 20 with excess glycine and dialyzed (10,000 MWCO, Pierce) overnight against PBS.

Identification Of Serum Proteins Bound To The Surface Of *Staphylococcus epidermidis*

- Serum proteins eluted from the bacteria under these conditions were compared by SDS-PAGE to normal rabbit serum and to the bacterial proteins eluted
- 25 from the surface of *Staphylococcus epidermidis* grown in TSB. See Figure 3. Buffers containing 0.5 NaCl, 1M NaCl and 4M urea each eluted bound serum proteins from the bacterial cells. These eluted serum proteins represent a pool of proteins eluted from the bacterial surface that is enriched for serum proteins. Some bacterial proteins are likely present in this pool, however no bacterial proteins detectable by

protein assay were eluted from bacteria grown in TSB. Although some faint protein bands were detected by silver stain to be eluted from TSB grown bacteria, they did not correspond to the more intensely stained proteins eluted from the surface of the bacteria grown in serum. Elution with 1M NaCl was the least denaturing condition that eluted the most proteins and was used to elute proteins for the following examples.

In order to identify cell wall associated proteins involved in binding serum components, biotin labeled serum proteins were used to probe 2D transfers by incubating a solution of the labeled proteins with the nitrocellulose bound cell wall proteins transferred from a 2D gel. To isolate serum proteins that bind to *Staphylococcus epidermidis*, bacteria grown in 70% rabbit serum were washed with 1 M NaCl. The eluted serum proteins were collected and dialyzed into PBS. Next, the naturally occurring immune IgG that may be present in the eluted serum proteins was depleted by incubation with protein G sepharose. Removal of IgG reduces the likelihood of identifying a protein that is reactive with host antibodies. The eluted serum proteins were then biotin labeled as described above and used to probe a 2D blot of *Staphylococcus epidermidis* cell surface proteins. See Fig 4A and 4B. Thirty-four spots and regions were visualized by this method and are likely involved in the interaction of *Staphylococcus epidermidis* with host serum proteins. Of the 34 spots consistently found to interact with serum components all but 4 were found to react with the immune sera from infected rabbits. See Fig 2 and Table 3.

Staphylococcus epidermidis grown in serum had serum proteins bound to bacterial surface proteins that were eluted with 0.5M and 1M NaCl. Under the same conditions few staphylococcal proteins were eluted from bacteria grown in TSB however it is possible that a staphylococcal protein expressed only in the serum is eluted by the high salt treatment.

Example 5

Mass Spectroscopy Identification of Serum Upregulated Proteins

Bacteria grown in 70% serum were used in subsequent proteomic experiments and analyses, working under the assumption that the changes detected during growth in serum may more accurately reflect alterations in gene expression

made by the bacteria in response to environmental cues seen within a host. In the following mass spectroscopy studies, proteins isolated from spots on 2D gel electrophoresis separations were first subjected to time-of-flight mass spectroscopy.

If a positive, unambiguous identification was obtained then no further mass

- 5 spectrometric analysis was performed. See Table 4. In the cases where some ambiguity remained after time-of-flight mass spectroscopy, such as when multiple proteins resolved to the same spot on the 2D gel, then electrospray mass spectroscopy was performed to resolve the ambiguity. See Table 4.

nnnq3

Table 4
Proteins Identified by Mass Spectroscopy

Orf	Protein SEQ ID NO:	DNA SEQ ID NO:	2-D Gel Spot Number
121	1	33	38
305	2	34	27, 30-32
321	3	35	11
373	4	36	18
554	5	37	29
639	6	38	42
608	7	39	28,
702	8	40	28
793	9	41	39
847	10	42	12, 13, 15, 16
854	11	43	4, 5-7, 9, 10
1016	12	44	1, 2, 3
1069	13	45	34
1238	14	46	40, 41
1382	15	47	44
1405	16	48	43
1450	17	49	19, 20-23, 25
1622	18	50	4, 10
1545	19	51	3
1653	20	62	40,
1690	21	53	8
1703	22	54	28, 33
2006	23	55	19
2180	24	56	43
2214	25	57	17
2482	26	58	13
2580	27	59	40
2649	28	60	10
2653	29	61	38
2736	30	62	24, 26
2807	31	63	
2875	32	64	39, 43

Sample Preparation

- 5 Prior to performing mass spectrometry, the target protein spots were subjected to in-gel tryptic digestion. Protein spots were removed from the gel and cut into ~1mm pieces. The gel pieces were washed three times with 0.2 ml of 50% (v/v) acetonitrile (Burdick & Jackson, Muskegon, MI) in 10mM ammonium bicarbonate

52

non

- (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) for 15 minutes with occasional vortexing. The gel pieces were dehydrated with acetonitrile for 5 minutes, lyophilized, and stored frozen at -20°C. Proteins in the gel were then digested with 50 µl of 12 ng/ml sequencing grade modified trypsin (Promega Corporation, Madison, WI) overnight at 37 °C. The trypsin solution was then removed and the gel again dehydrated in 50 µl acetonitrile. The peptide-containing acetonitrile was then removed and the gel pieces washed in 50 µl 5% formic acid (Riedel-de Haën, Seelze, Germany) for 15 minutes at room temperature in a bath sonicator (Branson Cleaning Equipment Co., Shelton, CT). The peptide-containing supernatant was removed and combined with the initial acetonitrile wash. The gel was again washed in acetonitrile and the supernatant combined with two previous extraction steps and dried in a SpeedVac (Thermo Savant) to ~10 µl, then diluted to 100µl with 0.1% (v/v) aqueous formic acid. The sample was then loaded onto a Zip-Tip_{C18} P10 column (Waters Corporation, Milford, MA) and eluted in 50µl of 50% acetonitrile/ 0.1% formic acid. Samples were transferred to a 96 X 2 well Teflon coated stainless steel plate (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA) for mass fingerprinting analysis on the MALDI-ToF Instrument (PerSeptive Biosystems) glass nanospray tips (New Objective Inc., Woburn, MA) to be sprayed in the orifice of the ion trap mass spectrometer.

Peptide Mass Fingerprinting Using ToF Mass Spectrometry

- Each sample was applied to the Teflon coated stainless steel 96 X 2 well plate with the α-cyano-4-hydroxycinnamic acid thin-layer application. The samples were allowed to dry at room temperature. Mass spectral data were acquired on a Voyager DE-STR MALDI-ToF mass spectrometer (PerSeptive Biosystems) equipped with delayed extraction technology, and a reflector. The mass spectrometer was equipped with a nitrogen laser at 337 nm and a laser rate of 3 Hz. Accelerating voltage was set at 20 kV, mode of operation (reflector), extraction mode (delayed), polarity (positive), grid voltage (85%), mirror voltage ratio (1.12), extraction delay time (200 nsec), mass range (800-3500 Da), and laser shots per spectrum (200).

Static Nanospray Ion Trap-Mass Spectrometry

- Mass spectral data were acquired on a ThermoFinnigan LCQ DECA quadrupole ion trap mass spectrometer (ThermoFinnigan, San Jose, CA) equipped

with a nano-electrospray interface. The nano-electrospray interface consisted of a silica spray needle, ~27 mm length by 120/68 µm OD/ID, 2 µm orifice diameter (New Objective Inc.). The glass tip was mounted in a x,y,z axis holder (ThermoFinnigan) held on a base positioned at the front of the mass spectrometer detector. Electrical
5 current was applied to the standard coating of the glass tip to supply an electrical connection for the electrospray interface through a metal connection on the static nanospray probe (ThermoFinnigan). The nanospray delivered a flow of 20 -80 nl/min.

Two to five microliters of the tryptic digest was analyzed using a nanospray
10 glass tip spraying directly into the orifice of the mass spectrometer. Peptide analyses were conducted on the LCQ-DECA ion trap mass spectrometer (ThermoFinnigan) operating at a variable spray voltage of ~1 kV, and using a heated capillary temperature of 200° C. Data sets were acquired in automated MS/MS mode using the data acquisition software provided with the instrument. The acquisition method
15 included 1 MS scan (400-1800 m/z) followed by MS/MS scans of the top three most abundant ions in the MS scan. The dynamic exclusion function was employed to increase the number of peptide ions that were analyzed (settings: 3 amu = exclusion width, 0.5 minutes = exclusion duration). The current experiment was analyzed in groups of samples and in a manual fashion.

20 Automated analysis of mass fingerprinting data was performed using MSFIT (Protein Prospector) and MASCOT (Matrix Science) software database search engines using Incyte's PathoSeq(c) *Staphylococcus epidermidis* 0-47 database. The resultant spectra were processed with baseline correction, noise removal, and peak de-isotoping before utilizing the search engines. The database search parameters
25 were set at the following levels: MW (1000 - 150 kDa), pI (3 - 10), Digest (trypsin), max. number of missed cleavages (2), missed cleavages pfactor (0.4), static modification (cysteine modified by acrylamide), N terminus (hydrogen), C terminus (free acid), variable mode (oxidation of methionine, N-terminus acetylation, phosphorylation of serine, threonine, and tyrosine), Mass (monoisotopic), min.
30 number of peptides required to match (4) with a mass tolerance of 300 ppm, and the application of iterative calibration (Intelcast) with a mass tolerance of 15 ppm.

Protein identifications were determined by MOWSE score and a 95% confidence score by MS-FIT and MASCOT respectively.

Automated analysis of MS/MS data was performed using SEQUEST incorporated into the Finnigan Bioworks data analysis package (ThermoFinnigan).

- 5 See Eng, J.K., et al., J Amer Soc Mass Spec, 5(11): p. 978-89 (1994). The following variable modifications were allowed in the software: cysteine acrylamide modification and oxidation of methionine. The search parameters were set at the following designations: mass range (400 – 3500 Da), lower intensity MS signal ($1e^{-16}$), peptide tolerance (2.0 Da), min. number of fragment ions (15), min. number of scans in a
- 10 group (1), and maximum number of missed cleavages (2). All protein identifications were manually verified for accuracy.

Identification Of Proteins By Mass Spectrometry

- Spots consistently detected on both fluorescent and immunostained transfers from *Staphylococcus epidermidis* grown in 70% serum, were located and labeled for
- 15 identification by mass spectrometry. See Figures 2A and 2B. A total of 40 immunoreactive spots were cut and subjected to mass spectrometric analysis for identification. See Table 4. The complete protein sequences are shown in the sequence listing (SEQ ID NOS:1-32). The protein-containing gel spots were cut out of a gel and identified by mass fingerprint analysis using MALDI-TOF followed by
- 20 searching Incyte's PathSeq(c) *Staphylococcus epidermidis* 0-47 database for the corresponding coding region. See Table 4. Spots with multiple protein hits or questionable signal were further analyzed using static nanospray. A total of 32 proteins was identified, with some spots containing more than one protein. See
- 25 Tables 3 and 4. Twenty-four of the proteins identified were immunoreactive, 28 bound to serum components and 20 of the proteins were both immunoreactive and serum binding. This large overlap was expected, as most proteins on the surface of *Staphylococcus epidermidis* involved in binding to serum factors would likely elicit an immune response.

- Six proteins were consistently present in immunostained blots, but no
- 30 corresponding spots were visibly present on the fluorescent stained transfers. See Figure 2B, white circles and arrow. Although these proteins are likely expressed

during an infection and elicit an immune response they are not expressed at levels that allow for their detection by fluorescent protein staining under the conditions used in these experiments.

Example 6

5

Prediction of Protein Function

The predicted function of the proteins was determined by comparison with complete genome homologs from ATCC12228. See Zhang, Y.Q., et al., Mol Microbiol, 49(6), p. 1577-93 (2003). The predicted functions shown in Table 5, are attributed to the respective ORFs by prior publications involving the specific protein or by homology to previously characterized proteins occurring in other organisms.

10

Table 5
Predicted Functions of *S. epidermidis* proteins

Spot #	Predicted function	Protein SEQ ID NO:	Method of detection
1,2	dihydrolipoamide dehydrogenase	12	I,S
3	"	12	I,S
	glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase	19	I,S
4	enolase	11	I,S
	elongation factor TU (EF-TU)	18	I,S
5-7, 9	enolase	11	I,S
8	phosphoglucosate dehydrogenase	21	I
10	enolase	11	I,S
	elongation factor TU (EF-TU)	18	I,S
	Na ⁺ /H ⁺ antiporter	28	I,S
11	alanine dehydrogenase	3	I,S
12	glyceraldehyde-3-phosphate dehydro (GAPDH)	10	I,S
13	"	"	I,S
	elongation factor (EF-T8)	26	I,S
14	no match		I,S
15-16	glyceraldehyde-3-phosphate dehydro (GAPDH)	10	I,S
17	acetyl-CoA C-acetyltransferase	25	I
18	cystathionine gamma-synthase	4	I

54

nnnn

19	ferrichrome binding lipoprotein	17	I, S
	oligopeptide permease	23	I, S
20-23, 25	ferrichrome binding lipoprotein	17	I, S
24	fructose-bisphosphate aldolase	30	I, S
28	"	"	I, S
	hypothetical protein	8	I, S
	hypothetical protein	7	I, S
27, 30- 32	lipoprotein (SitC)	2	I, S
28, 33	amino acid-binding lipoprotein	22	I, S
29	putative hexulose-6-phosphate synthase	5	I, S
34	lipote ligase	13	I, S
35	no match		I
36	no match		I
37	no match		I, S
38	immunodominant antigen A	29	I, S
	Putative protein	1	I, S
39	extracellular matrix binding protein (Embp)	32	I, S
40	cysteine synthase	14	S
	fructose-bisphosphate aldolase homologue	20	S
	thioredoxine reductase	27	S
41	cysteine synthase	14	S
42	putative transaldolase	6	I
43	extracellular matrix binding protein (Embp)	32	S
	transketolase	16	S
	hypothetical protein	24	S
44	glutaryl-tRNA ^{Gln} amidotransferase subunit	15	S

^aThe predicted function of the proteins was determined by comparison with complete genome homologs from ATCC12228.

^bMethod by which the spot was detected following transfer to nitrocellulose, reactive immune sera from infected rabbits, I, or binding serum components, S.

- 5 As discussed above, the expression profile of cell wall associated proteins from *Staphylococcus epidermidis* 0-47 grown in 70% rabbit serum was analyzed by 2D gel electrophoresis. The overall expression profile in serum was determined to be significantly different from that occurring following growth in TSB. Numerous

proteins that were upregulated during growth in serum were identified by mass spectroscopy and their functions predicted by sequence comparison. See Table 5. Three proteins predicted to be involved in nutrient acquisition, 305, 1450, and 1703 were all significantly increased. See Tables 4 and 5. All three proteins form streaks across the gel. See Figure 4. Without being bound by theory, this may be the consequence of multiple charge isomers or related to their predicted lipoprotein composition. Additionally, all three proteins are highly reactive with immune sera from rabbits infected with *Staphylococcus epidermidis* 0-47 suggesting that these proteins are also expressed in the host during an infection. See Figure 2 and Table 5. In total, 24 of these proteins were identified as reactive with immune sera from infected rabbits. Not only are these proteins expressed during growth in serum, but they also elicited an immune response in an infected animal. See Example 8. Taken together, these data suggest that these antigens are all expressed during an infection. Expression of the transcripts from these ORFs within the bloodstream of an infected mouse was confirmed by RT-PCR for all of the identified proteins (data not shown).

Example 7

Cloning And Expression Of Recombinant Proteins

Genes were cloned using primers designed based on the proteins identified by mass spectrometry of the expressed proteins and the *Staphylococcus epidermidis* 0-47 database. Individual genes were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using *Pfu Turbo* DNA polymerase (Stratagene, La Jolla, CA) and adenine overhangs were added with *Taq* DNA polymerase (Roche Diagnostics). The reaction products were cloned into pCRT7/NT-TOPO or pBAD/TOPOThio (Invitrogen, Carlsbad, CA) following the manufacturer's instructions and transformed into *E. coli* Top10 (Invitrogen). Positive clones were detected by colony PCR using Raddymix PCR mastermix (ABgene, Rochester, NY) and sequenced to ensure that no spurious mutations had arisen. Plasmids from pCRT7 clones were purified and transformed into *E. coli* BL21 (DE3) (Invitrogen) for expression using the T7 polymerase. Proteins were expressed by growth of the positive clones in HySoy broth (1% HySoy, Quest Intl, Stockbridge, GA), 0.5% yeast extract, 100 mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 40 mM NaH₂PO₄·H₂O) supplemented with 100 µg/ml ampicillin at 37 °C with shaking

55

nnnyg

(200 rpm) until $OD_{600} \sim 1.0$. Protein expression was induced with either 1 mM IPTG (pCRT7) or 0.2 % arabinose (pBAD) and the cultures were grown an additional 3 hours. The cells were then harvested by centrifugation and expression was assessed by SDS-PAGE of whole cell lysates.

5 Purification Of Recombinant Proteins

Cell pellets were resuspended in 100 ml TBS (20 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl) and lysed by one passage through a French pressure cell (SLM-Aminco, Rochester, NY). Samples were then separated into a soluble fraction or insoluble pellet by centrifugation at $10,000 \times g$ for 10 minutes. The location of recombinant protein was assessed by SDS-PAGE. If a recombinant protein was in the soluble fraction, then the protein was loaded onto Iminodiacetic acid agarose resin charged with Ni^{2+} . See Table 6. Next, the column was washed with 30 mM imidazole in TBS. Bound proteins were eluted with 300 mM imidazole in TBS. If an additional purification step was required, the proteins were dialyzed into 20 mM Tris, pH 8.0, containing 50 mM NaCl, 1 mM EDTA and loaded onto a column packed with POROS-Q resin (Applied Biosystems, Foster City, CA). Bound proteins were eluted with a 50 mM to 500 mM NaCl gradient in 20 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA. Fractions containing the protein of interest were determined by SDS-PAGE and frozen at $-20^{\circ}C$.

If a recombinant protein was found in the insoluble fraction, then the insoluble fraction was treated with 100 ml 1% Triton X-100 in TBS for 4 hours at $4^{\circ}C$. See Table 6. The insoluble proteins were pelleted by centrifugation and the supernatant discarded. The insoluble pellet was then extracted with 100 ml of 8 M urea in TBS for at least 8 hours at room temperature. Insoluble debris was pelleted and the protein was purified as above except all buffers contained 2M urea. Following purification Triton X-100 was added to a final concentration of 0.1%. The proteins were then dialyzed into TBS containing 0.1% Triton and stored at $-20^{\circ}C$.

All liquid chromatography was performed using an AKTA explorer (Amersham-Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). All SDS-PAGE was performed using 4-20% gradient Tris-glycine gels (Cambrex).

Table 6
Recombinant Protein Solubility

Orf	Protein SEQ ID NO:	Location of Recombinant Protein	
		Soluble Fraction	Insoluble Fraction
121	1		X
305	2	X	
321	3		X
373	4		X
554	5	X	
639	6	X	
608	7		X
702	8		X
793	9		X
847	10	X	
854	11		X
1015	12		X
1089	13		X
1238	14		X
1382	15		X
1405	16		X
1450	17	X	
1522	18		X
1545	19		X
1653	20		X
1690	21	X	
1703	22	X	
2008	23	NT	
2180	24		X
2214	25		X
2482	26	X	
2580	27	X	
2649	28		X
2653	29	X	
2736	30		X
2807	31	NT	
2875	32	NT	

X indicates the protein was found in that fraction. NT indicates not tested.

56

... nnnn

Example 8**Immunogenic Compositions Using Recombinant *Staphylococcus epidermidis* Proteins**

Four week-old female Balb/C mice (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) were immunized at 0, 3 and 6 weeks with 10 µg recombinant protein formulated with 20 µg STIMULON™ QS-21 by subcutaneous injection. The mice were bled on week 0 prior to the first immunization and on week 8. Two days following the final bleed, the mice were challenged by intraperitoneal injection of 5×10^8 cfu *Staphylococcus epidermidis* 0-47 grown overnight on Columbia salt agar (1x Columbia agar, 0.1% glucose, 1% yeast extract, 0.5% NaCl). Twenty-four hours following challenge, the mice were sacrificed and the bacteria were enumerated in the spleen and blood.

Active immunization of mice with recombinant proteins

Twenty-seven orfs encoding either serum-binding or immunoreactive proteins were cloned from *Staphylococcus epidermidis* 0-47 and the recombinant proteins were expressed in *E. coli* with a hexahistidine tag (The His-tag was used as a matter of convenience; an immunogenic composition of this invention would contain proteins expressed without a His-tag). See Table 7. These proteins were purified using a Ni²⁺ chelate column followed by ion exchange chromatography. The three remaining cloned orfs (2008, 2975 and 2907) were cloned but not expressed at levels sufficient for purification. Balb/C mice were immunized at 0, 3 and 6 weeks with individual recombinant proteins. The animals were bled at 0 and 6 weeks and challenged (i.p.) on week 8 with *Staphylococcus epidermidis* 0-47. Twenty-four hours following challenge, the animals were euthanized and the number of bacteria present in the blood and spleen enumerated. This initial screen of immunogenic composition candidates was performed on groups of 5 animals to enable for the screening of numerous proteins. The resulting data are not statistically significant but they did provide valuable information as to the immunogenic composition potential of a large number of candidates. Eight of twenty-seven recombinant proteins reduced the number of bacteria recovered from the spleen and/or blood by one log or more. See Table 7 (NT = not tested).

Table 7
Reductions in Bacterial Counts Following Immunization

Orf	Protein	Log CFU Reduction	
	SEQ ID NO:	Spleen.	Blood
121	1	NT	NT
305	2	0.8	1
321	3	0	1
373	4	0	0
554	5	0.5	0
639	6	0	0
608	7	0.5	0
702	8	0	0
793	9	NT	NT
847	10	0	0
854	11	1.5	0.7
1015	12	0	0
1069	13	1.1	0
1238	14	1	0.8
1382	15	0	0
1405	16	0	0
1450	17	0	0
1522	18	0	0
1545	19	0	0
1653	20	1	0
1690	21	0	0
1703	22	2	0
2006	23	NT	NT
2180	24	0	0
2214	25	1.2	0.9
2482	26	0	0
2580	27	0	0
2649	28	0.9	0
2653	29	0	0
2738	30	0	0
2907	31	NT	NT
2975	32	NT	NT

NT indicates not tested.

- The sera obtained from the immunized mice were evaluated for antibody
- 5 reactivity to the bacterial proteins. See Table 8. Twenty-three of twenty-four immune sera tested reacted with the native proteins, as determined by western blots of whole

57

nnn

cell lysates of *Staphylococcus epidermidis* grown to mid-log phase in rabbit serum.
See Table 8 (NT = not tested).

Table 8
Antibody Reactivity to Staphylococcal Protein

Orf	Protein SEQ ID NO:	Antibody Reactivity to Staphylococcal Protein	
		<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>
121	1	NT	NT
305	2	+	+
321	3	+	-
373	4	+	NT
554	5	-	NT
639	6	+	-
608	7	+	+
702	8	+	+
783	9	+	+
847	10	+	+
854	11	+	
1015	12	+	+
1069	13	+	+
1238	14	+	NT
1382	15	+	+
1405	16	+	+
1450	17	+	+
1522	18	+	+
1545	19	+	+
1653	20	+	NT
1690	21	+	+
1703	22	+	+
2008	23	NT	NT
2180	24	NT	NT
2214	25	+	+
2482	26	+	+
2580	27	+	NT
2649	28	+	+
2653	29	-	NT
2736	30	+	+
2907	31	NT	NT
2975	32	NT	NT

5 NT indicates not tested.

As shown in Table 8, many of the animals immunized with *Staphylococcus epidermidis* antigens also developed antibody responses to *Staphylococcus aureus*.

Therefore, immunogenic compositions against *Staphylococcus epidermidis* antigens could be effective in the treatment or prevention of *Staphylococcus aureus* as well as *Staphylococcus epidermidis*. See Table 8.

5 A subset of the recombinant proteins used in immunogenic compositions above were used to immunize larger groups of mice. Groups of 10 female (4 week-old) Balb/C mice were immunized by subcutaneous injection with saline or 10 µg of antigen with 20 µg STIMULON™ QS-21 as adjuvant. Two weeks following the last immunization, the mice were challenged with ~5 x 10⁸ cfu *S. epidermidis* 0-47 by intraperitoneal injection. Twenty-four hours after challenge, bacteria were
10 enumerated in the blood and spleen. See Table 9. Reduction in log CFU was determined as compared to a control of STIMULON™ QS-21 in saline. Data were analyzed by student's-T test with resulting p-values of *0.05 or **0.01.

Table 9
Proteins Used in Immunogenic Compositions

Orf	LOG CFU REDUCTION	
	Spleen	Blood
306	0.5	
321	0.7	1.2*
654	—	
608	0.3	
793	0.7	
854	0.9	
1069	1.6**	
1238	1.2*	1.2*
1853	0.4	
1703	0.8	
2214	1.4*	
2649	1.2*	

15 *p-value <0.05
**p-value <0.01

The *Staphylococcus epidermidis* proteins shown in Table 9 showed the greatest effectiveness when used in immunogenic compositions that reduced the severity of a bacterial infection following a subsequent challenge.

20

58

Example 9**Protection from *Staphylococcus aureus* Challenge Following Immunization With *Staphylococcus epidermidis* Proteins**

As suggested by the antibody binding data in Example 8, (Table 8),

- 5 Immunogenic compositions against *Staphylococcus epidermidis* antigens could be effective in the treatment or prevention of *Staphylococcus aureus*. Therefore, a challenge was performed using *Staphylococcus aureus* following immunization with immunogenic compositions of *Staphylococcus epidermidis* antigens.

- 10 Four week-old female CD-1 mice (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) were immunized at 0, 3 and 6 weeks with 10 µg recombinant protein in 20 µg STIMULON™ QS-21 by subcutaneous injection. The mice were bled on week 0 prior to the first immunization and on week 8. Two days following the final bleed the mice were challenged by intraperitoneal injection of 3×10^8 cfu *S. aureus* Reynolds grown overnight on Columbia salt agar (1x Columbia agar, 0.1% glucose, 1% yeast extract, 15 0.5% NaCl). Twenty-four hours following challenge, the mice were sacrificed and the bacteria were enumerated in the kidney.

Table 10**Challenge with *Staphylococcus aureus***

ORF	Protein SEQ ID NO:	Predicted Function	CFU reduction
2853	29	Immunodominant Ag A	0.9 log
321	3	alanine dehydrogenase	0.7 log
1015	12	dihydrolipoamide dehydrogenase	none
608	7	unknown	0.6 log
1069	13	lipote lipase	1.7 log
639	6	hypothetical	none

- 20 As shown in Table 10, certain *Staphylococcus epidermidis* antigens were effective in inducing antibodies that recognized and bound to *Staphylococcus aureus*. In addition, the induced antibodies had the beneficial effect of reducing the level of bacteria enumerated after a *Staphylococcus aureus* challenge.

000097

The percent identity of the amino acid sequence of the *Staphylococcus epidermidis* polypeptide antigens of SEQ ID NO:1 through SEQ ID NO:32 was compared to the amino acid sequence of their homologs from *Staphylococcus aureus*. The results are shown in Table 11.

5

Table 11
Identity between *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*

Orf	Polypeptide SEQ ID NO:	% Identity with Homolog in <i>S. aureus</i>
121	1	33%
305	2	78%
321	3	85%
373	4	81%
554	5	87%
639	6	82%
808	7	89%
702	8	87%
793	9	23%
847	10	95%
854	11	94%
1015	12	98%
1089	13	82%
1238	14	94%
1382	15	93%
1405	16	82%
1450	17	71%
1522	18	98%
1645	19	91%
1653	20	95%
1690	21	89%
1703	22	82%
2008	23	90%
2180	24	87%
2214	25	73%
2482	26	91%
2580	27	91%
2649	28	78%
2853	29	82%
2738	30	82%
2907	31	
2975	32	32%

Homology was determined between polypeptide sequences

.. n n n n n

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An immunogenic composition comprising a polypeptide having an amino acid sequence chosen from one or more of SEQ ID NO: 1 through SEQ ID NO: 32, a biological equivalent thereof, or a fragment thereof.
- 5 2. The immunogenic composition of claim 1, wherein the polypeptide is immunoreactive with antibodies in the serum of rabbits infected with *Staphylococcus epidermidis*.
3. The immunogenic composition of claim 1 or 2, wherein the polypeptide binds to one or more rabbit serum proteins.
- 10 4. The immunogenic composition according to any one or more of claims 1 to 3, further comprising a pharmaceutically acceptable carrier.
5. The immunogenic composition according to any one or more of claims 1 to 4, further comprising one or more adjuvants.
- 15 6. The immunogenic composition according to any one or more of claims 1 to 5, wherein the polypeptide is derived from *Staphylococcus epidermidis*.
7. The immunogenic composition according to any one or more of claims 1 to 6, wherein the polypeptide further comprises heterologous amino acids.
8. The immunogenic composition according to any one or more of claims 1 to 7, wherein the polypeptide is a fusion polypeptide.
- 20 9. The immunogenic composition according to any one or more of claims 1 to 8, wherein the polypeptide is a recombinant polypeptide.
10. The immunogenic composition according to any one or more of claims 1 to 9, wherein the polypeptide is isolated from *Staphylococcus epidermidis*.
- 25 11. The immunogenic composition according to any one or more of claims 1 to 10, wherein the polypeptide comprises a neutralizing epitope of *Staphylococcus epidermidis*.

12. The immunogenic composition according to any one or more of claims 1 to 11, wherein the polypeptide is a lipoprotein.
13. The immunogenic composition according to any one or more of claims 1 to 12, said composition further comprising a *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide antigen.
14. The immunogenic composition according to any one or more of claims 1 to 13, said composition further comprising a *Staphylococcus aureus* polysaccharide or polypeptide antigen.
15. The immunogenic composition according to any one or more of claims 1 to 14, wherein the polypeptide comprises a *Staphylococcus epidermidis* polypeptide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, and SEQ ID NO: 30, a biological equivalent thereof, or a fragment thereof.
16. The immunogenic composition according to any one or more of claims 1 to 15, wherein the polypeptide is encoded by a polynucleotide comprising a nucleotide sequence having at least about 95% identity to a nucleotide sequence chosen from one of SEQ ID NO: 33 through SEQ ID NO: 64 or a degenerate variant thereof, or a fragment thereof.
17. The immunogenic composition according to any one or more of claims 1 to 16, wherein the polynucleotide is derived from *Staphylococcus epidermidis*.
18. The immunogenic composition according to any one or more of claims 1 to 17, wherein the the *Staphylococcus epidermidis* polynucleotide sequence is selected from the group consisting of SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, and SEQ ID NO: 62, or a degenerate variant thereof, or a fragment thereof.

... n n n n n

19. The immunogenic composition according to any one or more of claims 1 to 18, wherein the polynucleotide further comprises heterologous nucleotides.
20. An immunogenic composition comprising a polynucleotide having a nucleotide sequence chosen from one of SEQ ID NO: 33 through SEQ ID NO: 64, a degenerate variant thereof, or a fragment thereof and is comprised in an expression vector.
21. The immunogenic composition of claim 20, wherein the the *Staphylococcus epidermidis* polynucleotide sequence is selected from the group consisting of SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, and SEQ ID NO: 62, or a degenerate variant thereof, or a fragment thereof.
22. The immunogenic composition of claim 20 or 21, wherein the vector is plasmid DNA.
23. The immunogenic composition according to any one or more of claims 20 to 22, wherein the polynucleotide is a recombinant polynucleotide.
24. The immunogenic composition according to any one or more of claims 20 to 23, wherein the polynucleotide is derived from *Staphylococcus epidermidis*.
25. The immunogenic composition of claim 24, wherein the polynucleotide comprises heterologous nucleotides.
26. The immunogenic composition according to any one or more of claim 20 to 23, wherein the polynucleotide is operatively linked to one or more gene expression regulatory elements.
27. The immunogenic composition of claim 24, wherein the polynucleotide directs the expression of a neutralizing epitope of *Staphylococcus epidermidis*.
28. The immunogenic composition according to any one or more of claims 20 to 23, further comprising a transfection facilitating agent.

. n n 1 n 1

29. The immunogenic composition of claim 28, wherein said transfection facilitating agent is bupivacaine.
30. A method of inducing an immune response against *Staphylococcus epidermidis* comprising administering to a mammal an immunogenic amount of a composition comprising: a polypeptide having an amino acid sequence chosen from one or more of SEQ ID NO: 1 through SEQ ID NO: 32 or a biological equivalent thereof, or a fragment thereof, and a pharmaceutically acceptable carrier.
31. The method of claim 30, wherein the polypeptide further comprises heterologous amino acids.
32. The method of claim 31, wherein the polypeptide is a fusion polypeptide.
33. The method of claim 30, further comprising an adjuvant.
34. The method of claim 30 or 31, wherein the polypeptide is a recombinant polypeptide.
35. A method of inducing an immune response against *Staphylococcus epidermidis* comprising administering to a mammal an immunogenic amount of a composition comprising: a polynucleotide having a nucleotide sequence chosen from one or more of SEQ ID NO: 33 through SEQ ID NO: 64, a degenerate variant thereof, or a fragment thereof and a pharmaceutically acceptable carrier.
36. The method of claim 35, further comprising a vector.
37. The method of claim 35, wherein the vector is plasmid DNA.
38. The method of claim 35, wherein the polynucleotide is a recombinant polynucleotide.
39. The method of claim 35, wherein the polynucleotide further comprises heterologous nucleotides.

40. The method of claim 35, wherein the polynucleotide is operatively linked to one or more gene expression regulatory elements.
41. The method of claim 35, further comprising an adjuvant.
42. The method of claim 35, wherein said composition further comprises a transfection facilitating agent.
- 5 43. The method of claim 42, wherein said transfection facilitating agent is bupivacaine.
44. A method of inducing an immune response against *Staphylococcus aureus* comprising administering to a mammal an immunogenic amount of a composition comprising: a *Staphylococcus epidermidis* polypeptide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, and SEQ ID NO: 30, a biological equivalent thereof, or a fragment thereof.
- 10 45. A method of inducing an immune response against *Staphylococcus aureus* comprising administering to a mammal an immunogenic amount of a composition comprising: a *Staphylococcus epidermidis* polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, and SEQ ID NO: 62, or a degenerate variant thereof, or a fragment thereof.
- 15 20 46. A method for the detection and/or identification of *Staphylococcus epidermidis* in a biological sample comprising:
- 25 (a) contacting the sample with an oligonucleotide probe of a polynucleotide comprising the nucleotide sequence chosen from one of SEQ ID NO:33 through SEQ ID NO: 64, or a degenerate variant thereof, or a fragment thereof, under conditions permitting hybridization; and

- (b) detecting the presence of hybridization complexes in the sample, wherein hybridization complexes indicate the presence of *Staphylococcus epidermidis* in the sample.
47. A method for the detection and/or identification of antibodies to
5 *Staphylococcus epidermidis* in a biological sample comprising:
- (a) contacting the sample with a polypeptide comprising an amino acid sequence chosen from one of SEQ ID NO: 1 through SEQ ID NO: 32 or a biological equivalent thereof, or a fragment thereof, under conditions permitting immune complex formation; and
- 10 (b) detecting the presence of immune complexes in the sample, wherein immune complexes indicate the presence of *Staphylococcus epidermidis* in the sample.
48. A composition according to any one or more of claims 1 to 29 for use in a
15 method of inducing an immune response against *Staphylococcus epidermidis*.

00101

Fig. 1

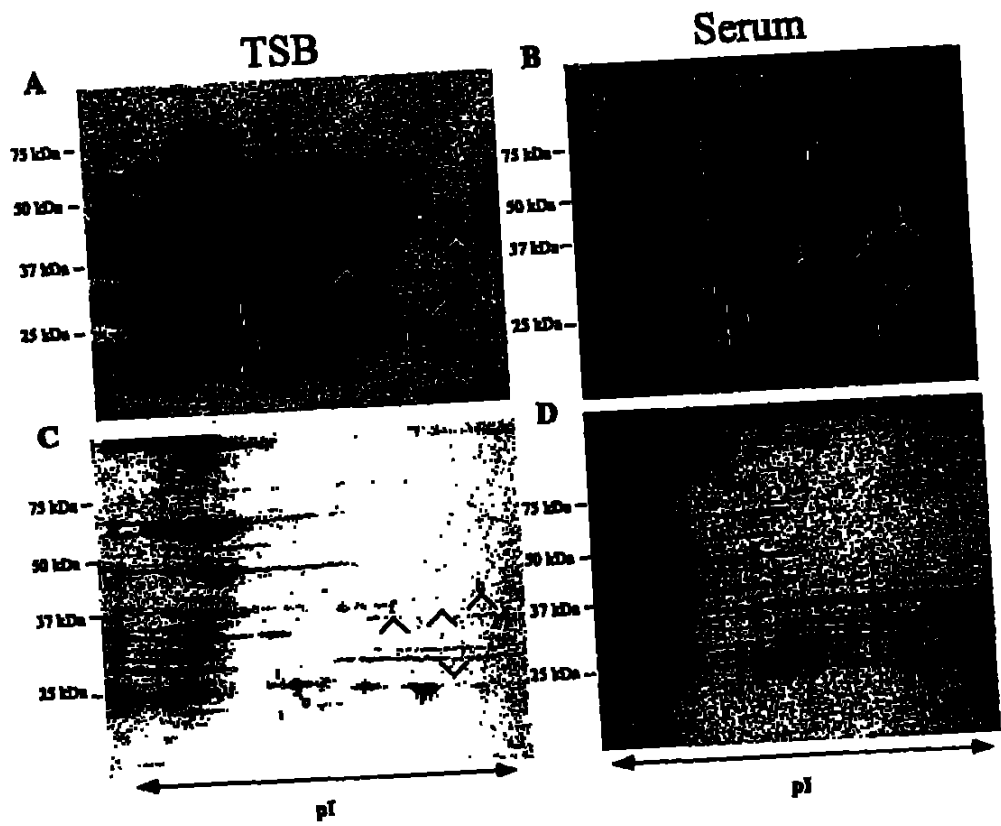


FIGURE 1

Fig. 2

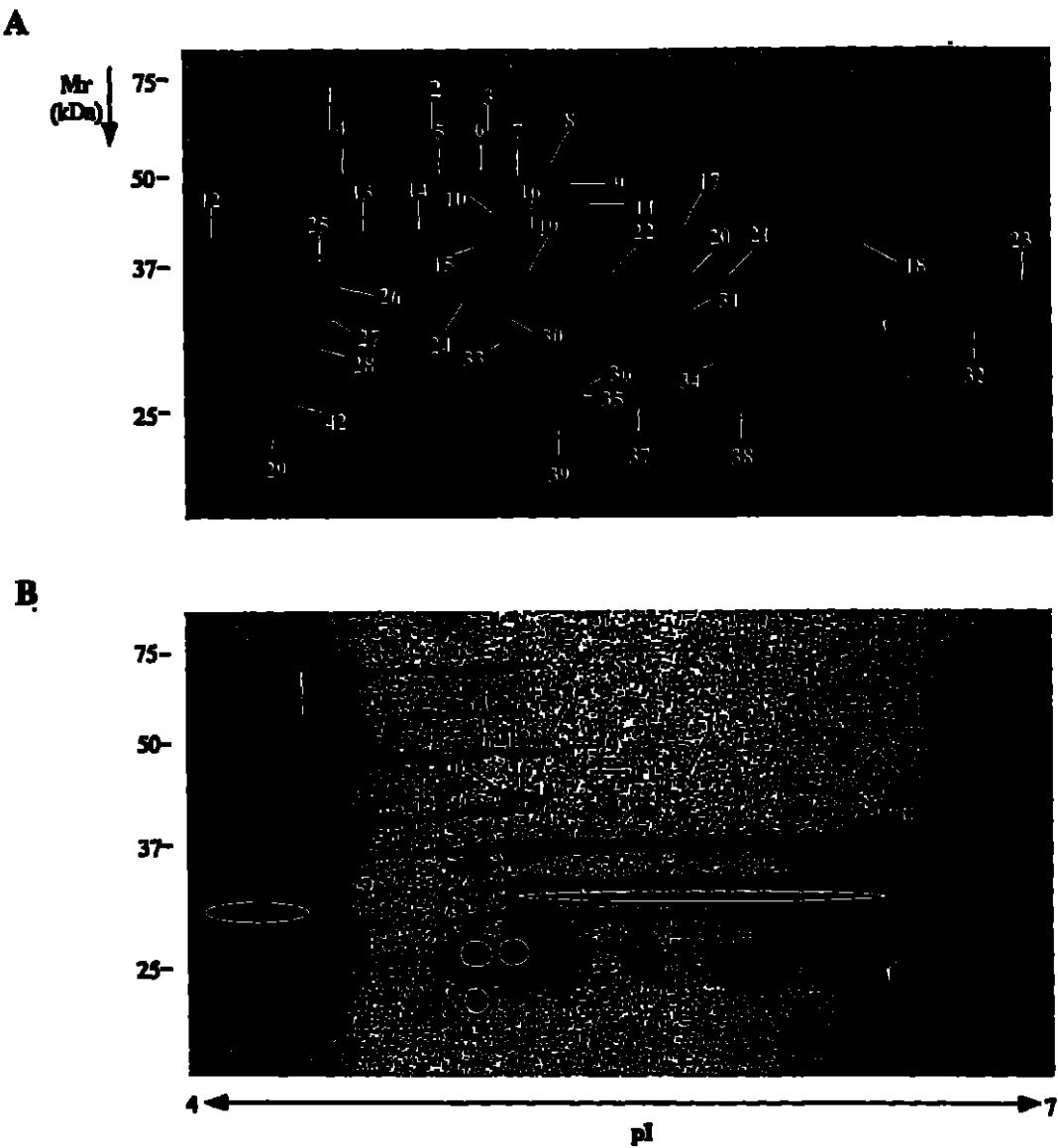


FIGURE 2

Fig. 3

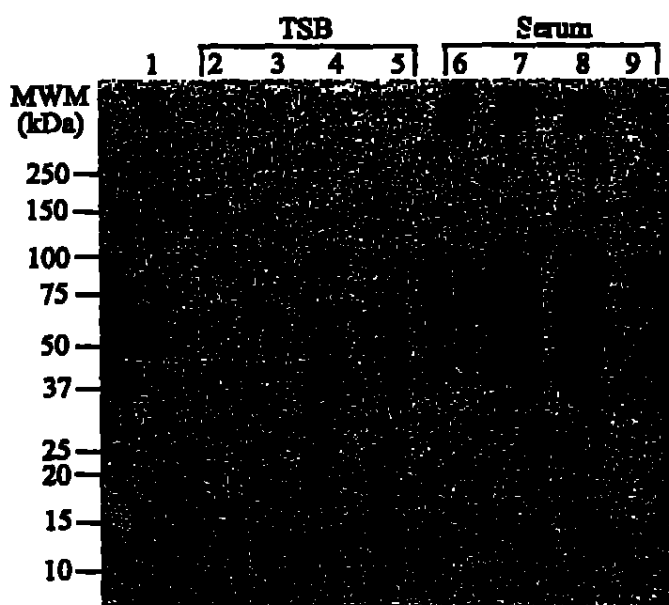


FIGURE 3

00107

Fig. 4

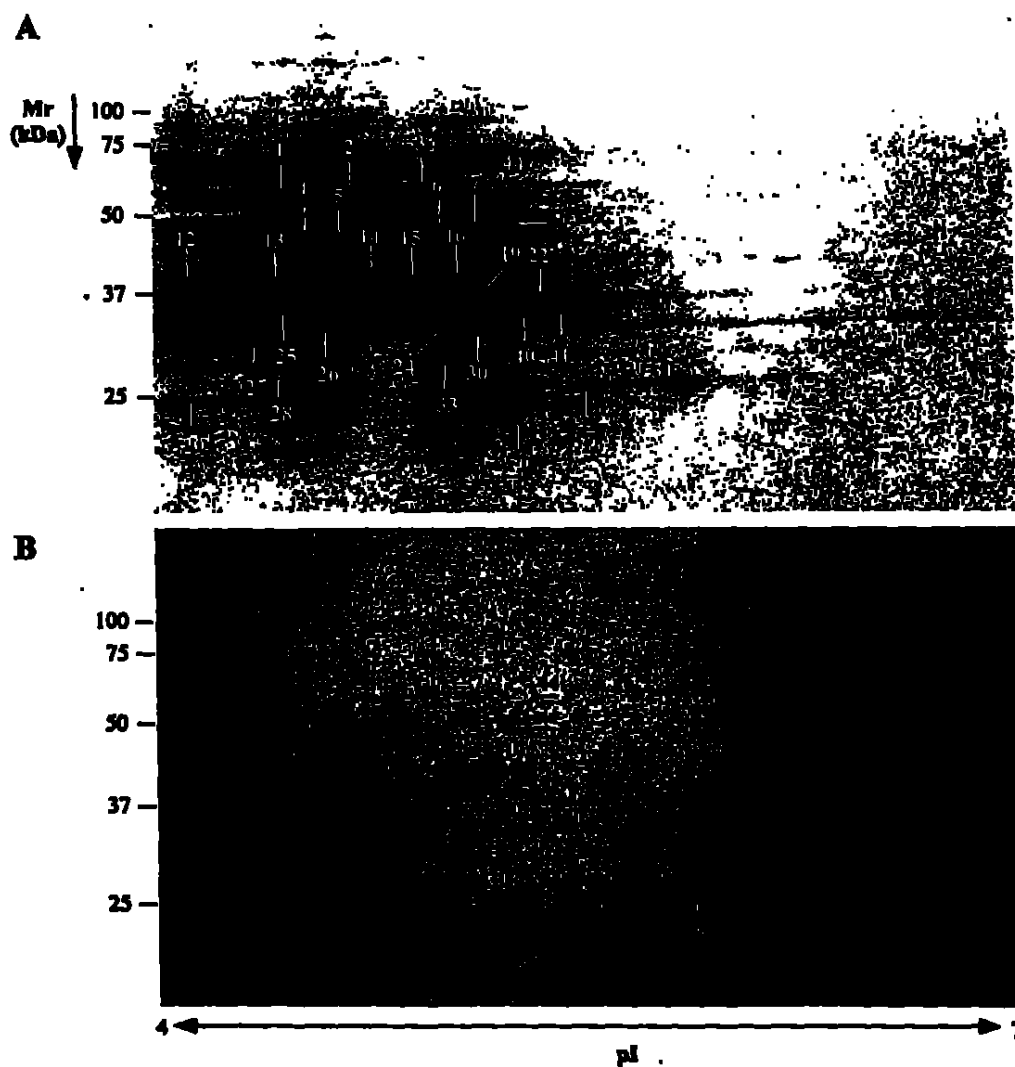


FIGURE 4

AM101548_Staph_Epi.ST25
SEQUENCE LISTING

<110> Wyeth
Sellman, Bret R.
Baker, Steven M.

nnf08

<120> Immunogenic Compositions of Staphylococcus Epidermidis Polypeptide Antigens

<130> AM101548

<160> 64

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 338

<212> PRT

<213> Staphylococcus epidermidis

<400> 1

Leu Arg Lys Asp Val Ile Glu Val Val Asn Lys Val Glu Asp Tyr Tyr
1 5 10 15

Phe Lys Ser Tyr Pro Ile Gln Tyr Asn Pro Ile Ile Glu Tyr Phe Asn
20 25 30

Gln Ile Lys Asn Lys Lys Val Ile Val Ser Leu Lys Ile Tyr Lys Val
35 40 45

Tyr Lys Lys Ile Val Glu Asn Ile His Asp Thr Glu Ser Gln Trp Ile
50 55 60

Tyr Ser Pro Glu His Ala Leu His Pro Ile Glu Phe Ile Glu Ser Phe
65 70 75 80

Cys Lys His Ile Lys Gly Lys Tyr Ala Gly Thr Pro Ile Glu Leu Glu
85 90 95

Leu Trp Gln Lys Ala Gly Ile Ala Thr Ile Phe Gly Phe Ile Asn Lys
100 105 110

Lys Thr Lys Glu Arg Lys Tyr Gln Glu Ile Phe Trp Val Val Ala Arg
115 120 125

Lys Asn Gly Lys Ser Thr Ile Ser Ser Gly Ile Ala Leu Tyr Leu Leu
130 135 140

Gly Ala Asp Gly Glu Gly Gly Pro Glu Val Tyr Thr Val Ala Thr Lys
145 150 155 160

Lys Asp Gln Ala Lys Ile Val Trp Asn Asp Ala Lys Lys Met Val Asn
165 170 175

Lys Ser Pro Leu Leu Lys Leu Asp Phe Val Thr Lys Val Ala Glu Ile
Page 1

AM101548_Staph_Epl.ST25

180

185

190

. n n i n g

Leu Thr Pro Phe Asn Asp Gly Gln Leu Ile Pro Leu Gly Arg Asp Ser
195 200 205

Asp Thr Thr Asp Gly Leu Asn Val His Gly Ala Ile Met Asp Glu Val
210 215 220

His Ala Trp Lys Thr Met Gln Met Tyr Asp Val Val Phe Asp Gly Ile
225 230 235 240

Ser Ala Arg Asp Asn Pro Leu Ile Leu Ala Ile Thr Thr Ala Gly Thr
245 250 255

Ile Arg Asn Ser Val Tyr Asp Ile Lys Tyr Glu Glu Ser Glu Asn Ile
260 265 270

Ile Asn Gly Leu Trp Glu Asp Glu Gly Tyr Lys Asn Glu Arg Phe Leu
275 280 285

Pro Leu Ile Tyr Glu Leu Asp Ser Arg Glu Glu Trp Ile Asp Glu Ser
290 295 300

Cys Trp Leu Lys Ala Asn Pro Gly Leu Gly Ser Ile Lys Lys Ile Asp
305 310 315 320

Ala Ile Lys Thr Lys Val Asn Arg Ala Lys Lys Asn Ala Leu Phe Arg
325 330 335

Ala Thr

<210> 2
<211> 309
<212> PRT
<213> Staphylococcus epidermidis

<400> 2

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
nnm

65 70 AM101548_Staph_Epi.ST25 80
75
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> 3
<211> 376
<212> PRT
<213> Staphylococcus epidermidis

. n0111

AM101548_Staph_Epi.ST25

<400> 3

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

AM101548_Staph_Epi.ST25

Asp Met Ile Lys Glu Met Lys Asp Gly Ser Val Ile Val Asp Ile Ala
 260 265 270

Ile Asp Gln Gly Gly Ile Phe Glu Thr Thr Asp Lys Ile Thr Thr His
 275 280 285

Asp Asn Pro Thr Tyr Thr Lys His Gly Val Val His Tyr Ala Val Ala
 290 295 300

Asn Met Pro Gly Ala Val Pro Arg Thr Ser Thr Ile Gly Leu Asn Asn
 305 310 315 320

Ala Thr Leu Pro Tyr Ala Gln Leu Leu Ala Asn Lys Gly Tyr Arg Glu
 325 330 335

Ala Phe Lys Val Asn His Pro Leu Ser Leu Gly Leu Asn Thr Phe Asn
 340 345 350

Gly His Val Thr Asn Lys Asn Val Ala Asp Thr Phe Asn Phe Glu Tyr
 355 360 365

Thr Ser Ile Glu Asp Ala Leu Lys
 370 375

<210> 4
 <211> 400
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus epidermidis

<400> 4

Met Glu Ala Ile Asp Thr Cys Pro Asn Lys Tyr Ser Thr Ile Arg Arg
 1 5 10 15

Val Leu Ile Met Asn Lys Lys Thr Gln Met Ile His Gly Gly His Thr
 20 25 30

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

Thr Tyr Leu Gln Asp Asp Ile Gly Asp Leu Arg Gln Gly Tyr Glu Tyr
 50 55 60

Ser Arg Thr Ala Asn Pro Thr Arg Ala Ser Leu Glu Ser Val Ile Ala
 65 70 75 80

Asn Leu Glu His Gly Lys His Gly Phe Ala Phe Gly Ser Gly Met Ala
 85 90 95

Ala Ile Ser Ala Val Ile Met Leu Leu Asp Lys Gly Asp His Leu Val
 100 105 110

AM101548_Staph_Epi_ST25

Leu Asn Ser Asp Val Tyr Gly Gly Thr Tyr Arg Ala Leu Thr Lys Val
 115 120 125

Phe Thr Arg Phe Gly Ile Asp Val Asp Phe Val Asp Thr Thr Lys Ile
 130 135 140

Glu Asn Ile Glu Gln Tyr Ile Lys Pro Glu Thr Lys Met Leu Tyr Val
 145 150 155 160

Glu Thr Pro Ser Asn Pro Leu Leu Arg Val Thr Asp Ile Lys Ala Ser
 165 170 175

Ala Lys Ile Ala Lys Lys Tyr Asp Leu Ile Ser Val Val Asp Asn Thr
 180 185 190

Phe Met Thr Pro Tyr Tyr Gln Asn Pro Leu Asp Phe Gly Ile Asp Ile
 195 200 205

Val Leu His Ser Ala Thr Lys Tyr Ile Gly Gly His Ser Asp Val Val
 210 215 220

Ala Gly Leu Val Ala Thr Ala Asp Asp Asp Leu Ala Glu Arg Leu Gly
 225 230 235 240

Phe Ile Ser Asn Ser Thr Gly Gly Val Leu Gly Pro Gln Asp Ser Tyr
 245 250 255

Leu Leu Ile Arg Gly Ile Lys Thr Leu Gly Leu Arg Met Glu Gln Ile
 260 265 270

Asn Arg Asn Val Glu Gly Ile Val Gln Met Leu Gln Lys His Pro Lys
 275 280 285

Val Gln Gln Val Phe His Pro Ser Ile Lys Glu His Met Asn Tyr Thr
 290 295 300

Ile His Gln Asn Gln Ala Thr Gly His Thr Gly Val Val Ser Phe Glu
 305 310 315 320

Val Lys Asp Thr Glu Ala Ala Lys Gln Val Ile His Ala Thr Asn Tyr
 325 330 335

Phe Thr Leu Ala Glu Ser Leu Gly Ala Val Glu Ser Leu Ile Ser Val
 340 345 350

Pro Ala Leu Met Thr His Ala Ser Ile Pro Ser Asp Val Arg Ala Lys
 355 360 365

Glu Gly Ile Thr Asp Gly Leu Ile Arg Leu Ser Ile Gly Ile Glu Asp
 370 375 380

67

AM101548_Staph_Epi.ST25

Thr Glu Asp Leu Val Asn Asp Leu Glu Gln Ala Leu Asn Thr Leu Arg
 385 390 395 400

nn+4

<210> 5
 <211> 210
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus epidermidis

<400> 5

Leu Glu Leu Gln Leu Ala Ile Asp Leu Leu Asn Lys Glu Glu Ala Ala
 1 5 10 15

Lys Leu Ala Gln Lys Val Glu Glu Tyr Val Asp Ile Val Glu Ile Gly
 20 25 30

Thr Pro Ile Val Ile Asn Glu Gly Leu Pro Ala Val Gln His Leu Asn
 35 40 45

Glu Asn Ile Asn Asn Ala Lys Val Leu Ala Asp Leu Lys Ile Met Asp
 50 55 60

Ala Ala Asp Tyr Glu Val Ser Gln Ala Val Lys Tyr Gly Ala Asp Ile
 65 70 75 80

Val Thr Ile Leu Gly Val Ala Glu Asp Ala Ser Ile Lys Ala Ala Val
 85 90 95

Glu Glu Ala His Lys His Gly Lys Ala Leu Leu Val Asp Met Ile Ala
 100 105 110

Val Gln Asn Leu Glu Gln Arg Ala Lys Glu Leu Asp Glu Met Gly Ala
 115 120 125

Asp Tyr Ile Ala Val His Thr Gly Tyr Asp Leu Gln Ala Glu Gly Lys
 130 135 140

Ser Pro Leu Asp Ser Leu Arg Thr Val Lys Ser Val Ile Lys Asn Ser
 145 150 155 160

Lys Val Ala Val Ala Gly Gly Ile Lys Pro Asp Thr Ile Lys Asp Ile
 165 170 175

Val Ala Glu Asp Pro Asp Leu Val Ile Val Gly Gly Gly Ile Ala Asn
 180 185 190

Ala Asp Asp Pro Val Glu Ala Ala Lys Gln Cys Arg Ala Ala Ile Glu
 195 200 205

Gly Lys
 210

AM101548_Staph_Epi.ST25

. 00115

<210> 6
 <211> 237
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus epidermidis
 <400> 6
 Met Thr Lys Leu Asn Val Lys Val Phe Ala Asp Gly Ala Asp Ile Glu
 1 5 10 15
 Glu Met Lys Ser Ala Tyr Lys Asn Gln Leu Val Asp Gly Phe Thr Thr
 20 25 30
 Asn Pro Ser Leu Met Ala Lys Ala Gly Val Thr Asp Tyr Lys Ala Phe
 35 40 45
 Ala Glu Glu Val Val Ser Glu Ile Pro Asp Ala Ser Ile Ser Phe Glu
 50 55 60
 Val Phe Ala Asp Asp Leu Pro Thr Met Glu Lys Glu Ala Glu Ile Leu
 65 70 75 80
 Lys Gln Tyr Gly Asp Asn Val Phe Val Lys Ile Pro Ile Val Thr Thr
 85 90 95
 Thr Gly Glu Ser Thr Leu Pro Leu Ile Lys Arg Leu Ser Ser Lys Gln
 100 105 110
 Val Arg Leu Asn Val Thr Ala Val Tyr Thr Ile Glu Gln Val Lys Ala
 115 120 125
 Ile Thr Asp Ala Val Thr Glu Gly Val Pro Thr Tyr Val Ser Val Phe
 130 135 140
 Ala Gly Arg Ile Ala Asp Thr Gly Val Asp Pro Leu Pro Leu Met Lys
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Lys Val Thr His Ser Lys Glu Gly Val Gln Leu Leu Trp
 165 170 175
 Ala Ser Cys Arg Glu Val Tyr Asn Val Ile Gln Ala Asp Glu Ile Gly
 180 185 190
 Ala Asp Ile Ile Thr Cys Pro Ala Asp Val Val Lys Lys Val Asn Asn
 195 200 205
 Asn Leu Gly Arg Asp Ile Gly Glu Leu Ser Val Asp Thr Val Lys Gly
 210 215 220
 Phe Ala Lys Asp Ile Gln Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu
 225 230 235

AM101548_Staph_Epi.ST25

<210> 7
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus epidermidis

<400> 7

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

AM101548_Staph_Epi.ST25

Asp Val Asp Leu Val Asp Gln Gln Arg Glu Tyr Ile Pro Val Phe Arg
245 250 255

. 00117

Asn Leu Lys Pro His Leu Tyr Lys
260

<210> 8
<211> 295
<212> PRT
<213> Staphylococcus epidermidis

<400> 8

Met Ser Lys Ile Val Gly Ser Asp Arg Val Lys Arg Gly Met Ala Glu
1 5 10 15

Met Gln Lys Gly Gly Val Ile Met Asp Val Val Asn Ala Glu Gln Ala
20 25 30

Lys Ile Ala Glu Glu Ala Gly Ala Val Ala Val Met Ala Leu Glu Arg
35 40 45

Val Pro Ser Asp Ile Arg Ala Ala Gly Gly Val Ala Arg Met Ala Asn
50 55 60

Pro Lys Ile Val Glu Glu Val Met Asn Ala Val Ser Ile Pro Val Met
65 70 75 80

Ala Lys Ala Arg Ile Gly His Ile Thr Glu Ala Arg Val Leu Glu Ser
85 90 95

Met Gly Val Asp Tyr Ile Asp Glu Ser Glu Val Leu Thr Pro Ala Asp
100 105 110

Glu Glu Tyr His Leu Arg Lys Asp Gln Phe Thr Val Pro Phe Val Cys
115 120 125

Gly Cys Arg Asn Leu Gly Glu Ala Ala Arg Arg Ile Gly Glu Gly Ala
130 135 140

Ala Met Leu Arg Thr Lys Gly Glu Pro Gly Thr Gly Asn Ile Val Glu
145 150 155 160

Ala Val Arg His Met Arg Arg Val Asn Ser Glu Val Ser Arg Leu Thr
165 170 175

Val Met Asn Asp Asp Glu Ile Met Thr Phe Ala Lys Asp Leu Gly Ala
180 185 190

Pro Tyr Glu Val Leu Lys Gln Ile Lys Asp Asn Gly Arg Leu Pro Val
195 200 205

69

AM101548_Staph_Epi.ST25

... 00142

Val Asn Phe Ala Ala Gly Gly Val Ala Thr Pro Gln Asp Ala Ala Leu
 210 215 220

Met Met Glu Leu Gly Ala Asp Gly Val Phe Val Gly Ser Gly Ile Phe
 225 230 235 240

Lys Ser Glu Asp Pro Glu Lys Phe Ala Lys Ala Ile Val Gln Ala Thr
 245 250 255

Thr His Tyr Gln Asp Tyr Glu Leu Ile Gly Lys Leu Ala Ser Glu Leu
 260 265 270

Gly Thr Ala Met Lys Gly Leu Asp Ile Asn Gln Ile Ser Leu Glu Glu
 275 280 285

Arg Met Gln Glu Arg Gly Trp
 290 295

<210> 9
 <211> 581
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus epidermidis

<400> 9

Met Glu Asp Ala Val Val Glu Met Asp Ala Val Lys Tyr Leu Asn Lys
 1 5 10 15

Leu Asn Leu Asp Asn Ile Glu Leu Thr Lys Tyr Leu Phe Phe Thr Gly
 20 25 30

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

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

Ser Asn Leu Gln Asp Val Phe Gln Met Glu Leu Ser Asn Lys Leu Thr
 65 70 75 80

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

Val Ala Ala Asp Asp Tyr Lys Ala Gln Ser Ile Glu Pro Tyr Glu Gly
 100 105 110

Ile Leu Pro Glu Asp Val Leu Ser Glu Met Lys Glu Gln Leu Ser Gly
 115 120 125

Ser Cys Thr Val Glu Val Ala Ala Phe Asn Glu Phe Thr Asn Phe Leu
 130 135 140

AM101548_Staph_Epi.ST25

. nn119

Ser Asp Lys Thr Leu Glu Gln Glu Phe Asp Phe Ile Ile Phe Asp Thr
 145 150 155 160
 Ala Pro Thr Gly His Thr Leu Arg Met Leu Glu Leu Pro Ser Ala Trp
 165 170 175
 Thr Asp Tyr Leu Asn Thr Thr Ser Asn Asp Ala Ser Cys Leu Gly Gln
 180 185 190
 Leu Ser Gly Leu Asn Glu Asn Arg Val Lys Tyr Asn Ser Ala Leu Glu
 195 200 205
 Lys Leu Arg Asn Gln Asp Asp Thr Thr Met Met Leu Val Ala Arg Pro
 210 215 220
 Thr His Ser Ser Ile Tyr Glu Ile Gln Arg Ala Gln Gln Glu Leu Gln
 225 230 235 240
 Gln Leu Ser Ile Ser Lys Phe Lys Val Ile Ile Asn Asn Tyr Ile Glu
 245 250 255
 Glu Ser His Gly Leu Ile Ser Ser Gln Met Lys Ser Glu Gln Asp Lys
 260 265 270
 Asn Ile Asn His Phe Thr Glu Trp Leu Asn Asn Asn His Ala Tyr Tyr
 275 280 285
 Val Pro Tyr Lys Asn Gln Lys Glu Glu Gly Ile Glu Ser Leu Thr Asn
 290 295 300
 Leu Leu Asn Asp Asp Asn Leu Ile Glu Asn Asp Asp Phe Ile Val Glu
 305 310 315 320
 Asp His Pro Gln Phe Asn Lys Leu Ile Asp Glu Ile Glu Asn Ser Lys
 325 330 335
 Val Gln Tyr Leu Phe Thr Met Gly Lys Gly Gly Val Gly Lys Thr Thr
 340 345 350
 Val Ala Thr Gln Leu Ala Thr Thr Leu Ser Asn Lys Gly Tyr Arg Val
 355 360 365
 Leu Leu Ala Thr Thr Asp Pro Thr Lys Glu Ile Asn Val Glu Thr Thr
 370 375 380
 Ser Asn Leu Asn Thr Ala Tyr Ile Asp Glu Glu Gln Ala Leu Glu Lys
 385 390 395 400
 Tyr Lys Lys Glu Val Leu Ala Thr Val Asn Asp Asp Thr Pro Gln Asp
 405 410 415

70

nn+28

AM101548_Staph_Epi.ST25

Asp Ile Asp Tyr Ile Met Glu Asp Leu Lys Ser Pro Cys Thr Glu Glu
 420 425 430

Ile Ala Phe Phe Lys Ala Phe Ser Asp Ile Met Glu Asn Gln Asp Asp
 435 440 445

Met Asp Tyr Val Ile Val Asp Thr Ala Pro Thr Gly His Thr Leu Leu
 450 455 460

Leu Leu Asp Ser Ser Glu Asn His His Arg Glu Leu Lys Lys Lys Ser
 465 470 475 480

Thr Gln Thr Thr Ser Asn Val Glu Thr Leu Leu Pro Lys Ile Gln Asn
 485 490 495

Lys Asn Leu Thr Gln Met Ile Ile Val Thr Leu Ala Glu Lys Thr Pro
 500 505 510

Tyr Leu Glu Ser Lys Arg Leu Val Glu Asp Leu Asn Arg Ala Asn Ile
 515 520 525

Gly His Asn Trp Trp Val Val Asn Gln Ser Leu Val Thr Leu Asn Gln
 530 535 540

Arg Asp Asp Leu Phe Ser Asn Lys Lys Glu Asp Glu Ser Phe Trp Ile
 545 550 555 560

Asn Lys Ile Lys Asn Glu Ser Leu Asp Asn Tyr Phe Val Ile Pro Tyr
 565 570 575

Arg Val Leu Glu Tyr
 580

<210> 10
 <211> 336
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus epidermidis

<400> 10

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

Ala Phe Arg Arg Ile Gln Asp Val Glu Gly Leu Glu Val Val Ala Val
 20 25 30

Asn Asp Leu Thr Asp Asp Asp Met Leu Ala His Leu Leu Lys Tyr Asp
 35 40 45

Thr Met Gln Gly Arg Phe Thr Gly Glu Val Glu Val Ile Glu Gly Gly
 50 55 60

AK101548_Staph_Epi.ST25

nn121

Phe Arg Val Asn Gly Lys Glu Ile Lys Ser Phe Asp Glu Pro Asp Ala
 65 70 75 80
 Gly Lys Leu Pro Trp Gly Asp Leu Asp Ile Asp Val Val Leu Glu Cys
 85 90 95
 Thr Gly Phe Tyr Thr Asp Lys Glu Lys Ala Gln Ala His Ile Asp Ala
 100 105 110
 Gly Ala Lys Lys Val Leu Ile Ser Ala Pro Ala Lys Gly Asp Val Lys
 115 120 125
 Thr Ile Val Phe Asn Thr Asn His Asp Thr Leu Asp Gly Ser Glu Thr
 130 135 140
 Val Val Ser Gly Ala Ser Cys Thr Thr Asn Ser Leu Ala Pro Val Ala
 145 150 155 160
 Lys Val Leu Ser Asp Glu Phe Gly Leu Val Glu Gly Phe Met Thr Thr
 165 170 175
 Ile His Ala Tyr Thr Gly Asp Gln Asn Thr Gln Asp Ala Pro His Arg
 180 185 190
 Lys Gly Asp Lys Arg Arg Ala Arg Ala Ala Ala Glu Asn Ile Ile Pro
 195 200 205
 Asn Ser Thr Gly Ala Ala Lys Ala Ile Gly Lys Val Ile Pro Glu Ile
 210 215 220
 Asp Gly Lys Leu Asp Gly Gly Ala Gln Arg Val Pro Val Ala Thr Gly
 225 230 235 240
 Ser Leu Thr Glu Leu Thr Val Val Leu Asp Lys Gln Asp Val Thr Val
 245 250 255
 Asp Gln Val Asn Ser Ala Met Lys Gln Ala Ser Asp Glu Ser Phe Gly
 260 265 270
 Tyr Thr Glu Asp Glu Ile Val Ser Ser Asp Ile Val Gly Met Thr Tyr
 275 280 285
 Gly Ser Leu Phe Asp Ala Thr Gln Thr Arg Val Met Thr Val Gly Asp
 290 295 300
 Arg Gln Leu Val Lys Val Ala Ala Trp Tyr Asp Asn Glu Met Ser Tyr
 305 310 315 320
 Thr Ala Gln Leu Val Arg Thr Leu Ala His Leu Ala Glu Leu Ser Lys

AM101548_Staph_Epi.ST25

325

330

335

<210> 11
 <211> 434
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus epidermidis

<400> 11

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

nn123

AM101548_Staph_Epi.ST25

225 230 235 240

Leu Gly Phe Asp Cys Ala Ser Ser Glu Phe Tyr Glu Asn Gly Val Tyr
245 250 255

Asp Tyr Thr Lys Phe Glu Gly Glu His Gly Ala Lys Arg Ser Ala Ala
260 265 270

Glu Gln Val Asp Tyr Leu Glu Glu Leu Ile Gly Lys Tyr Pro Ile Ile
275 280 285

Thr Ile Glu Asp Gly Met Asp Glu Asn Asp Trp Glu Gly Trp Lys Gln
290 295 300

Leu Thr Asp Arg Ile Gly Asp Lys Val Gln Leu Val Gly Asp Asp Leu
305 310 315 320

Phe Val Thr Asn Thr Glu Ile Leu Ser Lys Gly Ile Glu Gln Gly Ile
325 330 335

Gly Asn Ser Ile Leu Ile Lys Val Asn Gln Ile Gly Thr Leu Thr Glu
340 345 350

Thr Phe Asp Ala Ile Glu Met Ala Gln Lys Ala Gly Tyr Thr Ala Val
355 360 365

Val Ser His Arg Ser Gly Glu Thr Glu Asp Thr Thr Ile Ala Asp Ile
370 375 380

Ala Val Ala Thr Asn Ala Gly Gln Ile Lys Thr Gly Ser Leu Ser Arg
385 390 395 400

Thr Asp Arg Ile Ala Lys Tyr Asn Gln Leu Leu Arg Ile Glu Asp Glu
405 410 415

Leu Tyr Glu Thr Ala Lys Phe Glu Gly Ile Lys Ser Phe Tyr Asn Leu
420 425 430

Asp Lys

<210> 12
<211> 468
<212> PRT
<213> Staphylococcus epidermidis

<400> 12

Met Val Val Gly Asp Phe Pro Ile Glu Thr Asp Thr Ile Val Ile Gly
1 5 10 15

Ala Gly Pro Gly Gly Tyr Val Ala Ala Ile Arg Ala Ala Gln Leu Gly
Page 16

72

AM101548_Staph_Epi.ST25

20

25

30

Gln Lys Val Thr Ile Val Glu Lys Gly Asn Leu Gly Gly Val Cys Leu
35 40 45

Asn Val Gly Cys Ile Pro Ser Lys Ala Leu Leu His Ala Ser His Arg
50 55 60

Phe Val Glu Ala Gln Asn Ser Glu Asn Leu Gly Val Ile Ala Glu Ser
65 70 75 80

Val Ser Leu Asn Tyr Gln Lys Val Gln Glu Phe Lys Thr Ser Val Val
85 90 95

Asn Lys Leu Thr Gly Gly Val Glu Gly Leu Leu Lys Gly Asn Lys Val
100 105 110

Glu Ile Val Arg Gly Glu Ala Tyr Phe Val Asp Asn Asn Ser Leu Arg
115 120 125

Val Met Asp Glu Lys Ser Ala Gln Thr Tyr Asn Phe Lys His Ala Ile
130 135 140

Ile Ala Thr Gly Ser Arg Pro Ile Glu Ile Pro Asn Phe Glu Phe Gly
145 150 155 160

Lys Arg Val Ile Asp Ser Thr Gly Ala Leu Asn Leu Gln Glu Val Pro
165 170 175

Asn Lys Leu Val Val Val Gly Gly Gly Tyr Ile Gly Ser Glu Leu Gly
180 185 190

Thr Ala Phe Ala Asn Phe Gly Ser Glu Val Thr Ile Leu Glu Gly Ala
195 200 205

Lys Asp Ile Leu Gly Gly Phe Glu Lys Gln Met Thr Gln Pro Val Lys
210 215 220

Lys Gly Met Lys Glu Lys Gly Ile Glu Ile Val Thr Glu Ala Met Ala
225 230 235 240

Lys Ser Ala Glu Glu Thr Glu Asn Gly Val Lys Val Thr Tyr Glu Ala
245 250 255

Lys Gly Glu Glu Gln Thr Ile Glu Ala Asp Tyr Val Leu Val Thr Val
260 265 270

Gly Arg Arg Pro Asn Thr Asp Glu Leu Gly Leu Glu Glu Leu Gly Leu
275 280 285

nn 126

AM101548_Staph_Epi.ST25

Lys Phe Ala Asp Arg Gly Leu Leu Glu Val Asp Lys Gln Ser Arg Thr
 290 295 300

Ser Ile Glu Asn Ile Phe Ala Ile Gly Asp Ile Val Pro Gly Leu Pro
 305 310 315 320

Leu Ala His Lys Ala Ser Tyr Glu Gly Lys Val Ala Ala Glu Ala Ile
 325 330 335

Asp Gly Gln Ala Ala Glu Val Asp Tyr Ile Gly Met Pro Ala Val Cys
 340 345 350

Phe Thr Glu Pro Glu Leu Ala Gln Val Gly Tyr Thr Glu Ala Gln Ala
 355 360 365

Lys Glu Glu Gly Leu Ser Ile Lys Ala Ser Lys Phe Pro Tyr Ala Ala
 370 375 380

Asn Gly Arg Ala Leu Ser Leu Asp Asp Thr Asn Gly Phe Val Lys Leu
 385 390 395 400

Ile Thr Leu Lys Glu Asp Asp Thr Leu Ile Gly Ala Gln Val Val Gly
 405 410 415

Thr Gly Ala Ser Asp Ile Ile Ser Glu Leu Gly Leu Ala Ile Glu Ser
 420 425 430

Gly Met Asn Ala Glu Asp Ile Ala Leu Thr Val His Ala His Pro Thr
 435 440 445

Leu Gly Glu Met Thr Met Glu Ala Ala Glu Lys Ala Ile Gly Tyr Pro
 450 455 460

Ile His Thr Met
 465

<210> 13
 <211> 279
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus epidermidis

<400> 13

Met Asp Leu Ala Thr Lys Tyr Phe Asn Gln Ile Asn Trp Arg Tyr Val
 1 5 10 15

Asp His Ser Ser Gly Leu Glu Pro Met Gln Ser Phe Ala Phe Asp Asp
 20 25 30

Thr Phe Ser Glu Ser Val Gly Lys Asp Leu Ser Cys Asn Val Val Arg
 35 40 45

... 00175

Thr Trp Ile His Gln His Thr Val Ile Leu Gly Ile His Asp Ser Arg
 50 55 60
 Leu Pro Phe Leu Ser Asp Gly Ile Arg Phe Leu Thr Asp Glu Gln Gly
 65 70 75 80
 Tyr Asn Ala Ile Val Arg Asn Ser Gly Gly Leu Gly Val Val Leu Asp
 85 90 95
 Gln Gly Ile Leu Asn Ile Ser Leu Ile Phe Lys Gly Gln Thr Glu Thr
 100 105 110
 Thr Ile Asp Glu Ala Phe Thr Val Met Tyr Leu Leu Ile Asn Lys Met
 115 120 125
 Phe Glu Asp Glu Asp Val Ser Ile Asp Thr Lys Glu Ile Glu Gln Ser
 130 135 140
 Tyr Cys Pro Gly Lys Phe Asp Leu Ser Ile Asn Asp Lys Lys Phe Ala
 145 150 155 160
 Gly Ile Ser Gln Arg Arg Val Arg Gly Gly Ile Ala Val Gln Ile Tyr
 165 170 175
 Leu Cys Ile Glu Gly Ser Gly Ser Glu Arg Ala Leu Met Met Gln Gln
 180 185 190
 Phe Tyr Gln Arg Ala Leu Lys Gly Glu Thr Thr Lys Phe His Tyr Pro
 195 200 205
 Asp Ile Asp Pro Ser Cys Met Ala Ser Leu Glu Thr Leu Leu Asn Arg
 210 215 220
 Glu Ile Lys Val Gln Asp Val Met Phe Leu Leu Leu Tyr Ala Leu Lys
 225 230 235 240
 Asp Leu Gly Ala Asn Leu Asn Met Asp Pro Ile Thr Glu Asp Glu Trp
 245 250 255
 Thr Arg Tyr Glu Gly Tyr Tyr Asp Lys Met Leu Glu Arg Asn Ala Lys
 260 265 270
 Met Asn Glu Lys Leu Asp Phe
 275

<210> 14
 <211> 310
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus epidermidis
 <400> 14

AM101548_Staph_Epi.ST25

. 00127

Met Ala Gln Lys Pro Val Asp Tyr Val Thr Gln Ile Ile Gly Asn Thr
 1 5 10 15
 Pro Val Val Lys Leu Arg Asn Val Val Asp Asp Asp Ala Ala Asp Ile
 20 25 30
 Tyr Val Lys Leu Glu Tyr Gln Asn Pro Gly Gly Ser Val Lys Asp Arg
 35 40 45
 Ile Ala Leu Ala Met Ile Glu Lys Ala Glu Arg Glu Gly Lys Ile Lys
 50 55 60
 Pro Gly Asp Thr Ile Val Glu Pro Thr Ser Gly Asn Thr Gly Ile Gly
 65 70 75 80
 Leu Ala Phe Val Cys Ala Ala Lys Gly Tyr Lys Ala Val Phe Thr Met
 85 90 95
 Pro Glu Thr Met Ser Gln Glu Arg Arg Asn Leu Leu Lys Ala Tyr Gly
 100 105 110
 Ala Glu Leu Val Leu Thr Pro Gly Ser Glu Ala Met Lys Gly Ala Ile
 115 120 125
 Lys Lys Ala Lys Glu Leu Lys Glu Glu His Gly Tyr Phe Glu Pro Gln
 130 135 140
 Gln Phe Glu Asn Pro Ala Asn Pro Glu Ile His Glu Leu Thr Thr Gly
 145 150 155 160
 Pro Glu Leu Val Glu Gln Phe Glu Gly Arg Gln Ile Asp Ala Phe Leu
 165 170 175
 Ala Gly Val Gly Thr Gly Gly Thr Leu Ser Gly Val Gly Lys Val Leu
 180 185 190
 Lys Lys Glu Tyr Pro Asn Val Glu Ile Val Ala Ile Glu Pro Glu Ala
 195 200 205
 Ser Pro Val Leu Ser Gly Gly Glu Pro Gly Pro His Lys Leu Gln Gly
 210 215 220
 Leu Gly Ala Gly Phe Val Pro Asp Thr Leu Asn Thr Glu Val Tyr Asp
 225 230 235 240
 Ser Ile Ile Lys Val Gly Asn Asp Thr Ala Met Asp Met Ala Arg Arg
 245 250 255
 Val Ala Arg Glu Glu Gly Ile Leu Ala Gly Ile Ser Ser Gly Ala Ala
 260 265 270

AM101548_Staph_Epi.5T25

Ile Tyr Ala Ala Ile Gln Lys Ala Lys Glu Leu Gly Lys Gly Lys Thr
275 280 285

nn+8

Val Val Thr Val Leu Pro Ser Asn Gly Glu Arg Tyr Leu Ser Thr Pro
290 295 300

Leu Tyr Ser Phe Asp Asn
305 310

<210> 15
<211> 475
<212> PRT
<213> Staphylococcus epidermidis

<400> 15

Met His Phe Glu Thr Val Ile Gly Leu Glu Val His Val Glu Leu Lys
1 5 10 15

Thr Asp Ser Lys Met Phe Ser Pro Ser Pro Ala His Phe Gly Ala Glu
20 25 30

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

Pro Val Val Asn Arg Arg Ala Val Asp Trp Ala Met Arg Ala Ser Met
50 55 60

Ala Leu Asn Met Asp Ile Ala Thr Asn Ser Lys Phe Asp Arg Lys Asn
65 70 75 80

Tyr Phe Tyr Pro Asp Asn Pro Lys Ala Tyr Gln Ile Ser Gln Phe Asp
85 90 95

Gln Pro Ile Gly Glu Asn Gly Tyr Ile Asp Ile Glu Val Asp Gly Glu
100 105 110

Thr Lys Arg Ile Gly Ile Thr Arg Leu His Met Glu Glu Asp Ala Gly
115 120 125

Lys Ser Thr His Lys Asp Gly Tyr Ser Leu Val Asp Leu Asn Arg Gln
130 135 140

Gly Thr Pro Leu Ile Glu Ile Val Ser Glu Pro Asp Ile Arg Ser Pro
145 150 155 160

Lys Glu Ala Tyr Ala Tyr Leu Glu Lys Leu Arg Ser Ile Ile Gln Tyr
165 170 175

Thr Gly Val Ser Asp Cys Lys Met Glu Glu Gly Ser Leu Arg Cys Asp
180 185 190

AM101548_Staph_Epi.ST25

Ala Asn Ile Ser Leu Arg Pro Tyr Gly Gln Lys Glu Phe Gly Thr Lys
 195 200 205
 Thr Glu Leu Lys Asn Leu Asn Ser Phe Asn Tyr Val Lys Lys Gly Leu
 210 215 220
 Glu Tyr Glu Glu Lys Arg Gln Glu Glu Glu Leu Leu Asn Gly Gly Glu
 225 230 235 240
 Ile Gly Gln Glu Thr Arg Arg Phe Asp Glu Ser Thr Gly Lys Thr Ile
 245 250 255
 Leu Met Arg Val Lys Glu Gly Ser Asp Asp Tyr Arg Tyr Phe Pro Glu
 260 265 270
 Pro Asp Ile Val Pro Leu Tyr Val Asp Glu Asp Trp Lys Ala Arg Val
 275 280 285
 Arg Glu Thr Ile Pro Glu Leu Pro Asp Glu Arg Lys Ala Lys Tyr Val
 290 295 300
 Asn Asp Leu Gly Leu Pro Glu Tyr Asp Ala His Val Leu Thr Leu Thr
 305 310 315 320
 Lys Glu Met Ser Asp Phe Phe Glu Gly Ala Ile Asp His Gly Ala Asp
 325 330 335
 Val Lys Leu Thr Ser Asn Trp Leu Met Gly Gly Val Asn Glu Tyr Leu
 340 345 350
 Asn Lys Asn Gln Val Glu Leu Lys Asp Thr Gln Leu Thr Pro Glu Asn
 355 360 365
 Leu Ala Gly Met Ile Lys Leu Ile Glu Asp Gly Thr Met Ser Ser Lys
 370 375 380
 Ile Ala Lys Lys Val Phe Pro Glu Leu Ala Glu Asn Gly Gly Asp Ala
 385 390 395 400
 Lys Gln Ile Met Glu Asp Lys Gly Leu Val Gln Ile Ser Asp Glu Ala
 405 410 415
 Thr Leu Leu Lys Phe Val Thr Asp Ala Leu Asp Asn Asn Pro Gln Ser
 420 425 430
 Ile Glu Asp Tyr Lys Asn Gly Lys Gly Lys Ala Met Gly Phe Leu Val
 435 440 445
 Gly Gln Ile Met Lys Ala Ser Lys Gly Gln Ala Asn Pro Gln Lys Val
 450 455 460

75

AM101548_Staph_Epi.ST25

.. 001-98

Asn Ser Leu Leu Lys Gln Glu Leu Asp Asn Arg
465 470 475

<210> 16
<211> 364
<212> PRT
<213> Staphylococcus epidermidis

<400> 16

Met Leu Lys Arg Ala Asn Glu Asn Glu Glu Ala Trp Asn Asn Met Leu
1 5 10 15

Lys Asn Tyr Ser Glu Ala Tyr Pro Glu Leu Ala Glu Glu Phe Lys Leu
20 25 30

Ala Met Ser Gly Lys Leu Pro Asn Asn Tyr Ala Asp Ala Leu Pro Glu
35 40 45

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

Ile Gln Lys Leu Ser Glu Phe Val Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala
65 70 75 80

Asp Leu Ala Gly Ser Asn Lys Ser Asn Val Lys Glu Ala Lys Asp Tyr
85 90 95

Asn Lys Asp Thr Pro Glu Gly Lys Asn Val Trp Phe Gly Val Arg Glu
100 105 110

Phe Ala Met Gly Ala Ala Ile Asn Gly Met Ala Ala His Gly Gly Leu
115 120 125

His Pro Tyr Ala Ala Thr Phe Phe Val Phe Ser Asp Tyr Leu Lys Pro
130 135 140

Ala Leu Arg Leu Ser Ser Ile Met Gly Leu Asn Ser Thr Phe Ile Phe
145 150 155 160

Thr His Asp Ser Ile Ala Val Gly Glu Asp Gly Pro Thr His Glu Pro
165 170 175

Ile Glu Gln Leu Ala Gly Leu Arg Ala Ile Pro Asn Met Asn Val Ile
180 185 190

Arg Pro Ala Asp Gly Asn Glu Thr Arg Val Ala Trp Glu Val Ala Leu
195 200 205

Glu Ser Glu Gln Thr Pro Thr Ser Leu Val Leu Thr Arg Gln Asn Leu
210 215 220

AM101548_Staph_Ep1.ST25

. 00131

Pro Thr Leu Asp Val Asp Lys Gln Thr Val Glu Asn Gly Val Arg Lys
225 230 235 240
Gly Ala Tyr Ile Val Phe Glu Thr Glu Gln Gln Leu Glu Tyr Leu Leu
245 250 255
Leu Ala Ser Gly Ser Glu Val Asn Leu Ala Val Glu Ala Ala Lys Glu
260 265 270
Leu Glu Gln Gln Gly Lys Gly Val Arg Val Ile Ser Met Pro Asn Trp
275 280 285
Tyr Ala Phe Glu Gln Gln Ser Ser Glu Tyr Lys Glu Ser Ile Leu Pro
290 295 300
Ser Asp Val Thr Lys Arg Ile Ala Ile Glu Met Ala Ser Pro Leu Gly
305 310 315 320
Trp His Lys Tyr Val Gly Ile Glu Gly Lys Val Ile Gly Ile Asn Ser
325 330 335
Phe Gly Ala Ser Ala Pro Gly Asp Leu Val Val Glu Lys Tyr Gly Phe
340 345 350
Thr Lys Glu Asn Ile Leu Lys Gln Val Arg Ser Leu
355 360

<210> 17
<211> 334
<212> PRT
<213> Staphylococcus epidermidis

<400> 17

Val Glu Ser Val Arg Gly Leu Lys Ile Leu Ser Val Ile Gly Leu Leu
1 5 10 15
Phe Val Leu Ile Ala Thr Ala Ala Cys Gly Asn Asn Ser Ser Ser Asn
20 25 30
Ser Ser Lys Glu Ser Ser Lys Asp Gly Val Glu Ile Lys His Glu Glu
35 40 45
Gly Thr Thr Lys Val Pro Lys His Pro Lys Arg Val Val Val Leu Glu
50 55 60
Tyr Ser Phe Val Asp Ala Leu Val Ala Leu Asp Val Lys Pro Val Gly
65 70 75 80
Ile Ala Asp Asp Asn Lys Lys Asn Arg Ile Ile Lys Pro Leu Arg Asp
85 90 95

AM101548_Staph_Epl.ST25

Lys Ile Gly Lys Tyr Thr Ser Val Gly Thr Arg Lys Pro Pro Asn Leu
100 105 110

Glu Glu Ile Ser Lys Leu Lys Pro Asp Leu Ile Ile Ala Asp Asn Asn
115 120 125

Arg His Lys Gly Ile Tyr Lys Asp Leu Asn Lys Ile Ala Pro Thr Ile
130 135 140

Glu Leu Lys Ser Phe Asp Gly Asp Tyr Asn Glu Asn Ile Asp Ala Phe
145 150 155 160

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Leu Gly Lys Glu Glu Glu Gly Lys Lys Arg
165 170 175

Leu Glu Glu His Asp Lys Lys Ile Glu Glu Tyr Lys Lys Glu Ile Thr
180 185 190

Met Asp Lys Asn Gln Lys Val Leu Pro Ala Val Ala Ala Lys Ser Gly
195 200 205

Leu Leu Ala His Pro Ser Asn Ser Tyr Val Gly Gln Phe Leu Ser Gln
210 215 220

Leu Gly Phe Lys Glu Ala Leu Ser Asp Asp Val Thr Lys Gly Leu Ser
225 230 235 240

Lys Tyr Leu Lys Gly Pro Tyr Leu Gln Met Asn Thr Glu Thr Leu Ser
245 250 255

Gln Val Asn Pro Glu Arg Met Phe Ile Met Thr Asn Lys Ala Ser Ser
260 265 270

Asn Glu Pro Ser Leu Lys Glu Leu Glu Lys Asp Pro Val Trp Lys Lys
275 280 285

Leu Asn Ala Val Lys Asn Gln Arg Val Asp Ile Leu Asp Arg Asp Leu
290 295 300

Trp Ala Arg Ser Arg Gly Leu Ile Ser Ser Glu Glu Met Ala Lys Glu
305 310 315 320

Leu Val Glu Leu Ser Lys Thr Asp Ser Lys Lys Asp Asn Lys
325 330

<210> 18
<211> 411
<212> PRT
<213> Staphylococcus epidermidis

AM101548_Staph_Epl.ST25

<400> 18

Met Arg Asp Lys Phe Glu Ile Thr Phe Ile Lys Asn Arg Arg Asp Leu
1 5 10 15Ile Met Ala Lys Glu Lys Phe Asp Arg Ser Lys Glu His Ala Asn Ile
20 25 30Gly Thr Ile Gly His Val Asp His Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Ala
35 40 45Ile Ala Thr Val Leu Ala Lys Asn Gly Asp Thr Val Ala Gln Ser Tyr
50 55 60Asp Met Ile Asp Asn Ala Pro Glu Glu Lys Glu Arg Gly Ile Thr Ile
65 70 75 80Asn Thr Ala His Ile Glu Tyr Gln Thr Asp Lys Arg His Tyr Ala His
85 90 95Val Asp Cys Pro Gly His Ala Asp Tyr Val Lys Asn Met Ile Thr Gly
100 105 110Ala Ala Gln Met Asp Gly Gly Ile Leu Val Val Ser Ala Ala Asp Gly
115 120 125Pro Met Pro Gln Thr Arg Glu His Ile Leu Leu Ser Arg Asn Val Gly
130 135 140Val Pro Ala Leu Val Val Phe Leu Asn Lys Val Asp Met Val Asp Asp
145 150 155 160Glu Glu Leu Leu Glu Leu Val Glu Met Glu Val Arg Asp Leu Leu Ser
165 170 175Glu Tyr Asp Phe Pro Gly Asp Asp Val Pro Val Ile Ala Gly Ser Ala
180 185 190Leu Lys Ala Leu Glu Gly Asp Ala Glu Tyr Glu Gln Lys Ile Leu Asp
195 200 205Leu Met Gln Ala Val Asp Asp Tyr Ile Pro Thr Pro Glu Arg Asp Ser
210 215 220Asp Lys Pro Phe Met Met Pro Val Glu Asp Val Phe Ser Ile Thr Gly
225 230 235 240Arg Gly Thr Val Ala Thr Gly Arg Val Glu Arg Gly Gln Ile Lys Val
245 250 255Gly Glu Glu Val Glu Ile Ile Gly Met His Glu Thr Ser Lys Thr Thr
Page 26

AM101548_Staph_Epi.ST25

260

265

270

Val Thr Gly Val Glu Met Phe Arg Lys Leu Leu Asp Tyr Ala Glu Ala
 275 280 285

nnn

Gly Asp Asn Ile Gly Ala Leu Leu Arg Gly Val Ala Arg Glu Asp Val
 290 295 300

Gln Arg Gly Gln Val Leu Ala Ala Pro Gly Ser Ile Thr Pro His Thr
 305 310 315 320

Lys Phe Lys Ala Glu Val Tyr Val Leu Ser Lys Asp Glu Gly Gly Arg
 325 330 335

His Thr Pro Phe Phe Thr Asn Tyr Arg Pro Gln Phe Tyr Phe Arg Thr
 340 345 350

Thr Asp Val Thr Gly Val Val Asn Leu Pro Glu Gly Thr Glu Met Val
 355 360 365

Met Pro Gly Asp Asn Val Glu Met Thr Val Glu Leu Ile Ala Pro Ile
 370 375 380

Ala Ile Glu Asp Gly Thr Arg Phe Ser Ile Arg Glu Gly Gly Arg Thr
 385 390 395 400

Val Gly Ser Gly Val Val Thr Glu Ile Phe Glu
 405 410

<210> 19

<211> 428

<212> PRT

<213> Staphylococcus epidermidis

<400> 19

Met Met Ser Phe Glu Lys Ser Ile Lys Ala Met Glu Gln Ala Glu Lys
 1 5 10 15

Leu Met Pro Gly Gly Val Asn Ser Pro Val Arg Ala Phe Lys Ser Val
 20 25 30

Asp Thr Pro Ala Ile Phe Met Asp His Gly Glu Gly Ser Lys Ile Tyr
 35 40 45

Asp Ile Asp Gly Asn Glu Tyr Ile Asp Tyr Val Leu Ser Trp Gly Pro
 50 55 60

Leu Ile Leu Gly His Lys Asn Gln Gln Val Ile Ser Lys Leu His Glu
 65 70 75 80

Ala Val Asp Lys Gly Thr Ser Phe Gly Ala Ser Thr Leu Gln Glu Asn
 Page 27

AM101548_Staph_Epi.ST25

85

90

95

..a 00125

Lys Leu Ala Glu Leu Val Ile Asp Arg Val Pro Ser Ile Glu Lys Val
 100 105 110

Arg Met Val Ser Ser Gly Thr Glu Ala Thr Leu Asp Thr Leu Arg Leu
 115 120 125

Ala Arg Gly Tyr Thr Gly Arg Asn Lys Ile Ile Lys Phe Glu Gly Cys
 130 135 140

Tyr His Gly His Ser Asp Ser Leu Leu Ile Lys Ala Gly Ser Gly Val
 145 150 155 160

Ala Thr Leu Gly Leu Pro Asp Ser Pro Gly Val Pro Glu Gly Ile Ala
 165 170 175

Lys Asn Thr Ile Thr Val Pro Tyr Asn Asp Leu Asp Ser Leu Lys Leu
 180 185 190

Ala Phe Glu Lys Tyr Gly Asp Asp Ile Ala Gly Val Ile Val Glu Pro
 195 200 205

Val Ala Gly Asn Met Gly Val Val Pro Pro Val Asn Gly Phe Leu Gln
 210 215 220

Gly Leu Arg Asp Ile Thr Asn Glu Tyr Gly Ala Leu Leu Ile Phe Asp
 225 230 235 240

Glu Val Met Thr Gly Phe Arg Val Gly Tyr Asn Cys Ala Gln Gly Tyr
 245 250 255

Phe Gly Val Thr Pro Asp Leu Thr Cys Leu Gly Lys Val Ile Gly Gly
 260 265 270

Gly Leu Pro Val Gly Ala Phe Gly Gly Lys Lys Glu Ile Met Asp Tyr
 275 280 285

Ile Ala Pro Val Gly Thr Ile Tyr Gln Ala Gly Thr Leu Ser Gly Asn
 290 295 300

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

Glu Ser Tyr Glu Tyr Phe Asn Ser Leu Gly Asp Ile Leu Glu Lys Gly
 325 330 335

Leu Lys Glu Val Phe Ala Lys Tyr Asn Val Pro Ile Thr Val Asn Arg
 340 345 350

Ala Gly Ser Met Ile Gly Tyr Phe Leu Asn Glu Gly Pro Val Thr Asn
 355 360 365

Phe Glu Glu Ala Asn Lys Ser Asp Leu Lys Leu Phe Ser Asn Met Tyr
 370 375 380

Arg Glu Met Ala Lys Glu Gly Val Tyr Ile Pro Pro Ser Gln Phe Glu
 385 390 395 400

Gly Thr Phe Leu Ser Thr Ala His Thr Lys Asp Asp Ile Glu Lys Thr
 405 410 415

Ile Gln Ala Phe Asp Asn Ala Leu Ser Arg Ile Val
 420 425

<210> 20
 <211> 286
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus epidermidis

<400> 20

Met Pro Leu Val Ser Met Lys Glu Met Leu Ile Asp Ala Lys Glu Asn
 1 5 10 15

Gly Tyr Ala Val Gly Gln Tyr Asn Leu Asn Asn Leu Glu Phe Thr Gln
 20 25 30

Ala Ile Leu Glu Ala Ser Gln Glu Glu Asn Ala Pro Val Ile Leu Gly
 35 40 45

Val Ser Glu Gly Ala Ala Arg Tyr Met Ser Gly Phe Tyr Thr Val Val
 50 55 60

Lys Met Val Glu Gly Leu Met His Asp Leu Asn Ile Thr Ile Pro Val
 65 70 75 80

Ala Ile His Leu Asp His Gly Ser Ser Phe Glu Lys Cys Lys Glu Ala
 85 90 95

Ile Asp Ala Gly Phe Thr Ser Val Met Ile Asp Ala Ser His Ser Pro
 100 105 110

Phe Glu Glu Asn Val Glu Ile Thr Ser Lys Val Val Glu Tyr Ala His
 115 120 125

Asp Arg Gly Val Ser Val Glu Ala Glu Leu Gly Thr Val Gly Gly Gln
 130 135 140

Glu Asp Asp Val Val Ala Asp Gly Val Ile Tyr Ala Asp Pro Lys Glu
 145 150 155 160

nn137

AM101548_Staph_Epi.ST25
 Cys Gln Glu Leu Val Glu Lys Thr Gly Ile Asp Thr Leu Ala Pro Ala
 165 170 175
 Leu Gly Ser Val His Gly Pro Tyr Lys Gly Glu Pro Lys Leu Gly Phe
 180 185 190
 Lys Glu Met Glu Glu Ile Gly Ala Ser Thr Gly Leu Pro Leu Val Leu
 195 200 205
 His Gly Gly Thr Gly Ile Pro Thr Lys Asp Ile Gln Lys Ala Ile Pro
 210 215 220
 Tyr Gly Thr Ala Lys Ile Asn Val Asn Thr Glu Asn Gln Ile Ala Ser
 225 230 235 240
 Ala Lys Ala Val Arg Glu Val Leu Asn Asn Asp Lys Asp Val Tyr Asp
 245 250 255
 Pro Arg Lys Tyr Leu Gly Pro Ala Arg Glu Ala Ile Lys Glu Thr Val
 260 265 270
 Lys Gly Lys Ile Arg Glu Phe Gly Thr Ser Asn Arg Ala Lys
 275 280 285

<210> 21
 <211> 468
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus epidermidis

<400> 21

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

79

AM101548_Staph_Epi.ST25

Ala Leu Ala Glu Ser Ser Ile Asn Phe Ile Gly Met Gly Val Ser Gly
 115 120 125

Gly Glu Ile Gly Ala Leu Thr Gly Pro Ser Leu Met Pro Gly Gly Gln
 130 135 140

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

Lys Ala Gln Asp Gly Ala Ser Cys Val Thr Tyr Ile Gly Pro Asn Gly
 165 170 175

Ala Gly His Tyr Val Lys Met Val His Asn Gly Ile Glu Tyr Ala Asp
 180 185 190

Met Gln Leu Ile Ala Glu Ser Tyr Ala Met Met Lys Asp Leu Leu Gly
 195 200 205

Met Ser His Lys Glu Ile Ser Gln Thr Phe Lys Glu Trp Asn Ala Gly
 210 215 220

Glu Leu Glu Ser Tyr Leu Ile Glu Ile Thr Gly Asp Ile Phe Asn Lys
 225 230 235 240

Leu Asp Asp Asp Asn Glu Ala Leu Val Glu Lys Ile Leu Asp Thr Ala
 245 250 255

Gly Gln Lys Gly Thr Gly Lys Trp Thr Ser Ile Asn Ala Leu Glu Leu
 260 265 270

Gly Val Pro Leu Thr Ile Ile Thr Glu Ser Val Phe Ala Arg Phe Ile
 275 280 285

Ser Ser Ile Lys Glu Glu Arg Val Thr Ala Ser Lys Ser Leu Lys Gly
 290 295 300

Pro Lys Ala His Phe Glu Gly Asp Lys Lys Thr Phe Leu Glu Lys Ile
 305 310 315 320

Arg Lys Ala Leu Tyr Met Ser Lys Ile Cys Ser Tyr Ala Gln Gly Phe
 325 330 335

Ala Gln Met Arg Lys Ala Ser Glu Asp Asn Glu Trp Asn Leu Lys Leu
 340 345 350

Gly Glu Leu Ala Met Ile Trp Arg Glu Gly Cys Ile Ile Arg Ala Gln
 355 360 365

Phe Leu Gln Lys Ile Lys Asp Ala Tyr Asp Asn Asn Glu Asn Leu Gln
 370 375 380

. * 00128

AM101548_Staph_Epi.ST25

nn139

Asn Leu Leu Leu Asp Pro Tyr Phe Lys Asn Ile Val Met Glu Tyr Gln
385 390 395 400

Asp Ala Leu Arg Glu Val Val Ala Thr Ser Val Tyr Asn Gly Val Pro
405 410 415

Thr Pro Gly Phe Ser Ala Ser Ile Asn Tyr Tyr Asp Ser Tyr Arg Ser
420 425 430

Glu Asp Leu Pro Ala Asn Leu Ile Gln Ala Gln Arg Asp Tyr Phe Gly
435 440 445

Ala His Thr Tyr Glu Arg Lys Asp Arg Glu Gly Ile Phe His Thr Gln
450 455 460

Trp Val Glu Glu
465

<210> 22
<211> 262
<212> PRT
<213> Staphylococcus epidermidis

<400> 22

Met Lys Arg Leu Leu Leu Cys Ile Val Ala Leu Val Phe Val Leu Ala
1 5 10 15

Ala Cys Gly Asn Asn Ser Ser Asn Asn Lys Asp Asn Gln Ser Ser Ser
20 25 30

Lys Asp Lys Asp Thr Leu Arg Val Gly Thr Glu Gly Thr Tyr Ala Pro
35 40 45

Phe Thr Tyr His Asn Lys Lys Asp Gln Leu Thr Gly Tyr Asp Ile Asp
50 55 60

Val Ile Lys Ala Val Ala Lys Glu Glu Asn Leu Lys Leu Lys Phe Asn
65 70 75 80

Glu Thr Ser Trp Asp Ser Met Phe Ala Gly Leu Asp Ala Gly Arg Phe
85 90 95

Asp Val Ile Ala Asn Gln Val Gly Val Asn Lys Asp Arg Glu Lys Lys
100 105 110

Tyr Lys Phe Ser Glu Pro Tyr Thr Tyr Ser Ser Ala Val Leu Val Val
115 120 125

Arg Glu Asn Glu Lys Asp Ile Thr Ser Phe Asn Asp Val Lys Gly Lys
130 135 140

AM101548_Staph_Epi.ST25

non-10

Lys Leu Ala Gln Thr Phe Thr Ser Asn Tyr Gly Gln Leu Ala Lys Asp
145 150 155 160

Lys Gly Ala Asp Ile Thr Lys Val Asp Gly Phe Asn Gln Ser Met Asp
165 170 175

Leu Leu Leu Ser Lys Arg Val Asp Gly Thr Phe Asn Asp Ser Leu Ser
180 185 190

Tyr Leu Asp Tyr Arg Lys Gln Lys Pro Asn Ala Lys Ile Lys Ala Ile
195 200 205

Lys Gly His Ala Glu Gln Asn Lys Ser Ala Phe Ala Phe Ser Lys Lys
210 215 220

Val Asp Glu Lys Thr Ile Glu Lys Phe Asn Lys Gly Leu Glu Lys Ile
225 230 235 240

Arg Asp Asn Gly Glu Leu Ala Lys Ile Gly Lys Lys Trp Phe Gly Gln
245 250 255

Asp Val Ser Lys Pro Glu
260

<210> 23
<211> 310
<212> PRT
<213> Staphylococcus epidermidis

<400> 23

Val Tyr Met Thr Lys Tyr Val Leu Lys Arg Leu Cys Tyr Met Phe Val
1 5 10 15

Ser Leu Phe Ile Val Ile Thr Ile Thr Phe Phe Leu Met Lys Leu Met
20 25 30

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

Ile Leu Asn Glu Lys Tyr Gly Leu Asn Asp Pro Val Ala Leu Gln Tyr
50 55 60

Val Asn Tyr Leu Lys Asn Val Val Thr Gly Asp Phe Gly Asn Ser Phe
65 70 75 80

Gln Tyr His Asn Met Pro Val Trp Asp Leu Val Lys Pro Arg Leu Ile
85 90 95

Pro Ser Met Glu Met Gly Ile Thr Ala Met Val Ile Gly Val Val Leu
100 105 110

AM101548_Staph_Epl.ST25

▶ 00141

Gly Leu Val₁₁₅ Leu Gly Val₁₂₀ Ala₁₂₀ Ala Thr Lys Gln Asn Thr Trp Val₁₂₅
 Asp Tyr Thr Thr Thr Ile₁₃₅ Ile Ser Val Ile Ala Val₁₄₀ Ser Val Pro Ser
 Phe Val Leu Ala Val₁₅₀ Leu Leu Gln Tyr Val₁₅₅ Phe Ala Val Lys Leu Glu₁₆₀
 Trp Phe Pro Val₁₆₅ Ala Gly Trp Glu Gly Phe Ser Thr Ala Ile Leu Pro₁₇₅
 Ser Leu Ala₁₈₀ Leu Ser Ala Thr Val₁₈₅ Leu Ala Thr Val Ala Arg Tyr Ile₁₉₀
 Arg Ala Glu Met Ile Glu Val₂₀₀ Leu Ser Ser Asp Tyr Ile₂₀₅ Leu Leu Ala
 Arg Ala Lys Gly Asn Ser Thr Leu Lys Val Leu Phe Gly His Ala Leu₂₁₀
 Arg Asn Ala Leu Ile₂₁₅ Pro Ile Ile Thr Ile Ile Val Pro Met Leu Ala₂₂₀
 Gly Ile Leu Thr Gly Thr Leu Thr Ile₂₃₀ Glu Asn Ile Phe Gly Val Pro₂₃₅
 Gly Leu Gly Asp Gln Phe Val Arg Ser Ile Thr Thr Asn Asp Phe Ser₂₄₀
 Val Ile Met Ala Thr Thr Ile₂₄₅ Leu Phe Ser Thr Leu Phe Ile Val Ser₂₅₀
 Ile Phe Ile Val Asp Ile Leu Tyr Gly Val Ile₂₅₅ Asp Pro Arg Ile Arg₂₆₀
 Val Gln Gly Gly Lys Lys₂₆₅
 Val Gln Gly Gly Lys Lys₂₇₀
 Val Gln Gly Gly Lys Lys₂₇₅
 Val Gln Gly Gly Lys Lys₂₈₀
 Val Gln Gly Gly Lys Lys₂₈₅
 Val Gln Gly Gly Lys Lys₂₉₀
 Val Gln Gly Gly Lys Lys₂₉₅
 Val Gln Gly Gly Lys Lys₃₀₀
 Val Gln Gly Gly Lys Lys₃₀₅
 Val Gln Gly Gly Lys Lys₃₁₀

<210> 24
 <211> 514
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus epidermidis

<400> 24

Val Asn Glu Glu Gln Arg Lys Ala Gly Thr Ile Asn Ile Leu Ala Glu
 1 5 10 15
 Arg Asp Arg Lys Ala Glu Lys Asp Tyr Ser Lys Tyr Phe Glu Gln Val
 20 25 30

91

nn2

AM101548_Staph_Ep1.ST25

Tyr Gln Pro Pro Ser Leu Lys Glu Ala Lys Lys Arg Gly Lys Gln Glu
 35 40 45
 Val Gln Tyr Asn Arg Asp Phe His Ile Asp Glu Lys Tyr Lys Gly Met
 50 55 60
 Gly Lys Gly Arg Thr Phe Leu Ile Lys Thr Tyr Gly Cys Gln Met Asn
 65 70 75 80
 Ala His Asp Thr Glu Val Met Ala Gly Ile Leu Asn Ala Leu Gly Tyr
 85 90 95
 Ser Ala Thr Ser Asp Ile Asn Glu Ala Asp Val Ile Leu Ile Asn Thr
 100 105 110
 Cys Ala Ile Arg Glu Asn Ala Glu Asn Lys Val Phe Ser Glu Ile Gly
 115 120 125
 Asn Leu Lys His Leu Lys Lys Glu Arg Pro Asp Cys Leu Ile Gly Val
 130 135 140
 Cys Gly Cys Met Ser Gln Glu Glu Ser Val Val Asn Lys Ile Leu Lys
 145 150 155 160
 Ser Tyr Gln Asn Val Asp Met Val Phe Gly Thr His Asn Ile His His
 165 170 175
 Leu Pro Glu Ile Leu Glu Glu Ala Tyr Leu Ser Lys Ala Met Val Val
 180 185 190
 Glu Val Trp Ser Lys Glu Gly Asp Ile Ile Glu Asn Leu Pro Lys Val
 195 200 205
 Arg Asp Gly His Ile Lys Ala Trp Val Asn Ile Met Tyr Gly Cys Asp
 210 215 220
 Lys Phe Cys Thr Tyr Cys Ile Val Pro Phe Thr Arg Gly Lys Glu Arg
 225 230 235 240
 Ser Arg Arg Pro Glu Asp Ile Ile Asp Glu Val Arg Glu Leu Ala Arg
 245 250 255
 Glu Gly Tyr Gln Glu Ile Thr Leu Leu Gly Gln Asn Val Asn Ser Tyr
 260 265 270
 Gly Lys Asp Ile Glu Gly Leu Asp Tyr Glu Leu Gly Asp Leu Leu Glu
 275 280 285
 Asp Ile Ser Lys Ile Asp Ile Pro Arg Val Arg Phe Thr Thr Ser His
 290 295 300

AM101548_Staph_Epl.ST25

nn143

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

Thr Gln

<210> 25
 <211> 394
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus epidermidis

<400> 25

Met Ser Arg Ile Val Leu Ala Glu Ala Tyr Arg Thr Pro Ile Gly Val
 1 5 10 15

82

AM101548_Staph_Ep1.ST25

nn144

Phe Gly Gly Val Phe Lys Asp Ile Pro Ala Tyr Glu Leu Gly Ala Thr
 20 25 30
 Val Ile Arg Gln Ile Leu Glu His Ser Gln Ile Asp Pro Asn Glu Ile
 35 40 45
 Asn Glu Val Ile Leu Gly Asn Val Leu Gln Ala Gly Gln Gly Gln Asn
 50 55 60
 Pro Ala Arg Ile Ala Ala Ile His Gly Gly Val Pro Glu Ala Val Pro
 65 70 75 80
 Ser Phe Thr Val Asn Lys Val Cys Gly Ser Gly Leu Lys Ala Ile Gln
 85 90 95
 Leu Ala Tyr Gln Ser Ile Val Ala Gly Asp Asn Glu Ile Val Ile Ala
 100 105 110
 Gly Gly Met Glu Ser Met Ser Gln Ser Pro Met Leu Leu Lys Asn Ser
 115 120 125
 Arg Phe Gly Phe Lys Met Gly Asn Gln Thr Leu Glu Asp Ser Met Ile
 130 135 140
 Ala Asp Gly Leu Thr Asp Lys Phe Asn Asp Tyr His Met Gly Ile Thr
 145 150 155 160
 Ala Glu Asn Leu Val Glu Gln Tyr Gln Ile Ser Arg Lys Glu Gln Asp
 165 170 175
 Gln Phe Ala Phe Asp Ser Gln Gln Lys Ala Ser Arg Ala Gln Gln Ala
 180 185 190
 Gly Val Phe Asp Ala Glu Ile Val Pro Val Glu Val Pro Gln Arg Lys
 195 200 205
 Gly Asp Pro Leu Ile Ile Ser Gln Asp Glu Gly Ile Arg Pro Gln Thr
 210 215 220
 Thr Ile Asp Lys Leu Ala Gln Leu Arg Pro Ala Phe Lys Lys Asp Gly
 225 230 235 240
 Ser Val Thr Ala Gly Asn Ala Ser Gly Ile Asn Asp Gly Ala Ala Ala
 245 250 255
 Met Leu Val Met Thr Glu Asp Lys Ala Lys Ala Leu Gly Leu Gln Pro
 260 265 270
 Ile Ala Val Leu Asp Ser Phe Gly Ala Ser Gly Val Ala Pro Ser Ile
 Page 37

nn145

AM101548_Staph_Ep1.ST25
280 285

275

Met Gly Ile Gly Pro Val Glu Ala Ile His Lys Ala Leu Lys Arg Ser
290 295 300
Asn Lys Val Ile Asn Asp Val Asp Ile Phe Glu Leu Asn Glu Ala Phe
305 310 315 320
Ala Ala Gln Ser Ile Ala Val Asn Arg Glu Leu Gln Leu Pro Gln Asp
325 330 335
Lys Val Asn Val Asn Gly Gly Ala Ile Ala Leu Gly His Pro Ile Gly
340 345 350
Ala Ser Gly Ala Arg Thr Leu Val Ser Leu Leu His Gln Leu Ser Asp
355 360 365
Ala Lys Pro Thr Gly Val Ala Ser Leu Cys Ile Gly Gly Gly Gln Gly
370 375 380
Ile Ala Thr Val Val Ser Lys Tyr Glu Val
385 390

<210> 26
<211> 292
<212> PRT
<213> Staphylococcus epidermidis

<400> 26

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

Ser Lys Leu Ser Ser Gly Lys Thr Val Asp Glu Arg Met Lys Glu Ala
Page 38

83

115 AM101548_Staph_Epl.ST25
120 125

001726

Ile Ser Thr Ile Gly Glu Lys Leu Ser Ile Arg Arg Phe Ser Ile Arg
130 135 140
Thr Lys Thr Asp Asn Asp Ala Phe Gly Ala Tyr Leu His Met Gly Gly
145 150 155 160
Arg Ile Gly Val Leu Thr Val Val Glu Gly Thr Thr Asp Glu Glu Ala
165 170 175
Ala Lys Asp Val Ala Met His Ile Ala Ala Ile Asn Pro Lys Tyr Val
180 185 190
Ser Ser Glu Gln Val Ser Glu Glu Glu Ile Asn His Glu Arg Glu Val
195 200 205
Leu Lys Gln Gln Ala Leu Asn Glu Gly Lys Pro Glu Lys Ile Val Glu
210 215 220
Lys Met Val Glu Gly Arg Leu Arg Lys Tyr Leu Gln Glu Ile Cys Ala
225 230 235 240
Val Asp Gln Asn Phe Val Lys Asn Pro Asp Glu Thr Val Glu Ala Phe
245 250 255
Leu Lys Ala Lys Gly Gly Lys Leu Thr Asp Phe Val Arg Tyr Glu Val
260 265 270
Gly Glu Gly Met Glu Lys Arg Glu Glu Asn Phe Ala Glu Glu Val Lys
275 280 285
Gly Gln Met Lys
290

<210> 27
<211> 310
<212> PRT
<213> Staphylococcus epidermidis

<400> 27

Met Thr Glu Val Asp Phe Asp Val Ala Ile Ile Gly Ala Gly Pro Ala
1 5 10 15
Gly Met Thr Ala Ala Val Tyr Ala Ser Arg Ala Asn Leu Lys Thr Val
20 25 30
Met Ile Glu Arg Gly Met Pro Gly Gly Gln Met Ala Asn Thr Glu Glu
35 40 45
Val Glu Asn Phe Pro Gly Phe Glu Met Ile Thr Gly Pro Asp Leu Ser
Page 39

50 55 AM101548_Staph_Epi.ST25 60
 Thr Lys Met Phe Glu His Ala Lys Lys Phe Gly Ala Glu Tyr Gln Tyr
 65 70 75 80
 Gly Asp Ile Lys Ser Val Glu Asp Lys Gly Asp Tyr Lys Val Ile Asn
 85 90 95
 Leu Gly Asn Lys Glu Ile Thr Ala His Ala Val Ile Ile Ser Thr Gly
 100 105 110
 Ala Glu Tyr Lys Lys Ile Gly Val Pro Gly Glu Gln Glu Leu Gly Gly
 115 120 125
 Arg Gly Val Ser Tyr Cys Ala Val Cys Asp Gly Ala Phe Phe Lys Asn
 130 135 140
 Lys Arg Leu Phe Val Ile Gly Gly Gly Asp Ser Ala Val Glu Glu Gly
 145 150 155 160
 Thr Phe Leu Thr Lys Phe Ala Asp Lys Val Thr Ile Val His Arg Arg
 165 170 175
 Asp Glu Leu Arg Ala Gln Asn Ile Leu Gln Glu Arg Ala Phe Lys Asn
 180 185 190
 Asp Lys Val Asp Phe Ile Trp Ser His Thr Leu Lys Thr Ile Asn Glu
 195 200 205
 Lys Asp Gly Lys Val Gly Ser Val Thr Leu Glu Ser Thr Lys Asp Gly
 210 215 220
 Ala Glu Gln Thr Tyr Asp Ala Asp Gly Val Phe Ile Tyr Ile Gly Met
 225 230 235 240
 Lys Pro Leu Thr Ala Pro Phe Lys Asn Leu Gly Ile Thr Asn Asp Ala
 245 250 255
 Gly Tyr Ile Val Thr Gln Asp Asp Met Ser Thr Lys Val Arg Gly Ile
 260 265 270
 Phe Ala Ala Gly Asp Val Arg Asp Lys Gly Leu Arg Gln Ile Val Thr
 275 280 285
 Ala Thr Gly Asp Gly Ser Ile Ala Ala Gln Ser Ala Ala Asp Tyr Ile
 290 295 300
 Thr Glu Leu Lys Asp Asn
 305 310

84

AM101548_Staph_Ep1.ST25

<210> 28

<211> 465

<212> PRT

<213> Staphylococcus epidermidis

<400> 28

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

AM101548_Staph_Epi.ST25
 Trp Ile Pro Leu Ile Ile Ile Val Leu Cys Leu Ile Phe Arg Ile Ser
 245 250 255
 Thr Val Pro Ser Met Leu Ile Ser Ser Ile Ser Ala Leu Val Ile Gly
 260 265 270
 Thr Phe Asp His Gln Phe Asn Met Lys Asp Gly Phe Lys Ala Ser Phe
 275 280 285
 Asp Gly Phe Asn His Thr Met Leu His Gln Ser His Ile Ser Asp Asn
 290 295 300
 Ala Lys Thr Leu Ile Glu Gln Gly Gly Met Met Ser Met Thr Gln Ile
 305 310 315 320
 Ile Val Thr Ile Phe Cys Gly Tyr Ala Phe Ala Gly Ile Val Glu Lys
 325 330 335
 Ala Gly Cys Leu Asp Val Ile Leu Glu Thr Ile Ala Lys Gly Val Lys
 340 345 350
 Ser Val Gly Thr Leu Ile Leu Ile Thr Val Val Cys Ser Ile Met Leu
 355 360 365
 Val Phe Ala Ala Gly Val Ala Ser Ile Val Ile Ile Met Val Gly Val
 370 375 380
 Leu Met Lys Asp Met Phe Glu Lys Met Asn Val Ser Lys Ser Val Leu
 385 390 395 400
 Ser Arg Thr Leu Glu Asp Ser Ser Thr Met Val Leu Pro Leu Ile Pro
 405 410 415
 Trp Gly Thr Ser Gly Ile Tyr Tyr Ala His Gln Leu Asn Val Ser Val
 420 425 430
 Asp Gln Phe Phe Ile Trp Ala Ile Pro Cys Tyr Leu Cys Ala Phe Ile
 435 440 445
 Ala Ile Ile Tyr Gly Phe Thr Gly Ile Gly Ile Lys Lys Ile Ser Arg
 450 455 460

Lys
465

<210> 29
 <211> 235
 <212> PRT
 <213> staphylococcus epidermidis

<400> 29

25

AM101548_Staph_Epi.ST25

nmr

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

<210> 30
 <211> 296
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus epidermidis

<400> 30

AM101548_Staph_Epi.ST25

00151

Met Asn Lys Glu Gln Leu Glu Lys Met Thr His Gly Lys Gly Phe Ile
 1 5 10 15
 Ala Ala Leu Asp Gln Ser Gly Gly Ser Thr Pro Lys Ala Leu Lys Glu
 20 25 30
 Tyr Gly Val Asn Glu Asp Gln Tyr Ser Asn Glu Asp Glu Met Phe Gln
 35 40 45
 Leu Val His Asp Met Arg Thr Arg Val Val Thr Ser Pro Ser Phe Ser
 50 55 60
 Pro Asp Lys Ile Leu Gly Ala Ile Leu Phe Glu Gln Thr Met Asp Arg
 65 70 75 80
 Glu Val Glu Gly Lys Tyr Thr Gly Asp Tyr Leu Ala Asp Lys Gly Val
 85 90 95
 Val Pro Phe Leu Lys Val Asp Lys Gly Leu Ala Glu Glu Lys Asn Gly
 100 105 110
 Val Gln Leu Met Lys Pro Ile Asp Asp Leu Asp Glu Thr Leu Asp Arg
 115 120 125
 Ala Asn Glu Arg His Ile Phe Gly Thr Lys Met Arg Ser Asn Ile Leu
 130 135 140
 Glu Leu Asn Glu Gln Gly Ile Lys Asp Val Val Glu Gln Gln Phe Glu
 145 150 155 160
 Phe Ala Lys Lys Ile Ile Ala Lys Gly Leu Val Pro Ile Ile Glu Pro
 165 170 175
 Glu Val Asn Ile Asn Ala Lys Asp Lys Ser Glu Ile Glu Lys Val Leu
 180 185 190
 Lys Ala Glu Ile Lys Lys Gly Leu Asp Ser Leu Asn Asp Asp Gln Leu
 195 200 205
 Val Met Leu Lys Leu Thr Ile Pro Thr Glu Ala Asn Leu Tyr Lys Asp
 210 215 220
 Leu Ala Asp His Pro Asn Val Val Arg Val Val Val Leu Ser Gly Gly
 225 230 235 240
 Tyr Ser Arg Asp Glu Ala Asn Lys Leu Leu Lys Asp Asn Asp Glu Leu
 245 250 255
 Ile Ala Ser Phe Ser Arg Ala Leu Ala Ser Asp Leu Arg Ala Ser Gln
 260 265 270

AM101548_Staph_Epi.ST25

Ser Gln Glu Glu Phe Asp Lys Ala Leu Gly Asp Ala Val Asp Ser Ile
275 280 285

. 00152

Tyr Asp Ala Ser Val Asn Lys Asn
290 295

<210> 31
<211> 263
<212> PRT
<213> Staphylococcus epidermidis

<400> 31

Leu Lys Glu Arg Phe Ile Lys Lys Thr His Tyr Leu Asp Tyr Gln Phe
1 5 10 15

Asp Glu Pro Thr Asp Ile Lys Leu Gly Phe Thr Thr Arg Glu Asn Gly
20 25 30

Leu Ser Pro Tyr Pro Asn His Ser Phe Asn Met Ala Arg Tyr Ile Ser
35 40 45

Asp Ser Ala His His Ile Thr His His Gln Asp Ile Leu Ala Asn Leu
50 55 60

Ile Gly Tyr Pro Arg Asp Glu Trp Val Phe Pro Ile Gln Thr His Asp
65 70 75 80

Ser Arg Ile Val Glu Val Thr Ser Glu His Lys Gly Thr Asn Ile Asp
85 90 95

Glu Leu Thr Asp Asp Leu His Gly Ile Asp Gly Met Tyr Thr Phe Asp
100 105 110

Ser His Ile Leu Leu Thr Met Cys Tyr Ala Asp Cys Val Pro Val Tyr
115 120 125

Phe Tyr Ser Glu Pro His Gly Tyr Ile Gly Leu Ala His Ala Gly Trp
130 135 140

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

Phe Asp Tyr Glu Asp Leu Lys Ile Val Ile Gly Pro Ala Thr Ser Asn
165 170 175

Ser Tyr Glu Ile Asn Asp Asp Ile Lys Asn Lys Phe Glu Glu Leu Thr
180 185 190

Ile Asp Ser Thr Leu Tyr Ile Glu Thr Arg Gly Lys Asn Gln His Gly
195 200 205

AM101548_Staph_Ep1.ST25

Ile Asp Leu Lys Asn Ala Asn Ala Leu Leu Leu Glu Glu Ala Gly Val
 210 215 220

Pro Ser Lys Asn Ile Tyr Val Thr Glu Tyr Ala Thr Ser Glu Asn Leu
 225 230 235 240

Asp Leu Phe Phe Ser Tyr Arg Val Glu Lys Gly Gln Thr Gly Arg Met
 245 250 255

Leu Ala Phe Ile Gly Arg Lys
 260

<210> 32
 <211> 10203
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus epidermidis

<400> 32

Met Lys Ser Lys Pro Lys Leu Asn Gly Arg Asn Ile Cys Ser Phe Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Lys Cys Met Ser Tyr Ser Leu Ser Lys Leu Ser Thr Leu Lys
 20 25 30

Thr Tyr Asn Phe Gln Ile Thr Ser Asn Asn Lys Glu Lys Thr Ser Arg
 35 40 45

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

Ser Ile Arg Lys Tyr Ala Ile Gly Thr Phe Ser Thr Val Ile Ala Thr
 65 70 75 80

Leu Val Phe Met Gly Ile Asn Thr Asn His Ala Ser Ala Asp Glu Leu
 85 90 95

Asn Gln Asn Gln Lys Leu Ile Lys Gln Leu Asn Gln Thr Asp Asp Asp
 100 105 110

Asp Ser Asn Thr His Ser Gln Glu Ile Glu Asn Asn Lys Gln Asn Ser
 115 120 125

Ser Gly Gln Thr Glu Ser Leu Arg Ser Ser Thr Ser Gln Asn Gln Ala
 130 135 140

Asn Ala Arg Leu Ser Asp Gln Phe Lys Asp Thr Asn Glu Thr Ser Gln
 145 150 155 160

Gln Leu Pro Thr Asn Val Ser Asp Asp Ser Ile Asn Gln Ser His Ser
 165 170 175

87

AM101548_Staph_Epi.ST25

nn75

Glu Ala Asn Met Asn Asn Glu Pro Leu Lys Val Asp Asn Ser Thr Met
 180 185 190
 Gln Ala His Ser Lys Ile Val Ser Asp Ser Asp Gly Asn Ala Ser Glu
 195 200 205
 Asn Lys His His Lys Leu Thr Glu Asn Val Leu Ala Glu Ser Arg Ala
 210 215 220
 Ser Lys Asn Asp Lys Glu Lys Glu Asn Leu Gln Glu Lys Asp Lys Ser
 225 230 235 240
 Gln Gln Val His Pro Pro Leu Asp Lys Asn Ala Leu Gln Ala Phe Phe
 245 250 255
 Asp Ala Ser Tyr His Asn Tyr Arg Met Ile Asp Arg Asp Arg Ala Asp
 260 265 270
 Ala Thr Glu Tyr Gln Lys Val Lys Ser Thr Phe Asp Tyr Val Asn Asp
 275 280 285
 Leu Leu Gly Asn Asn Gln Asn Ile Pro Ser Glu Gln Leu Val Ser Ala
 290 295 300
 Tyr Gln Gln Leu Glu Lys Ala Leu Glu Leu Ala Arg Thr Leu Ser Gln
 305 310 315 320
 Arg Ser Thr Thr Glu Lys Arg Gly Arg Arg Ser Thr Arg Ser Val Val
 325 330 335
 Glu Asn Arg Ser Ser Arg Ser Asp Tyr Leu Asp Ala Arg Thr Glu Tyr
 340 345 350
 Tyr Val Ser Lys Asp Asp Asp Asp Ser Gly Phe Pro Pro Gly Thr Phe
 355 360 365
 Phe His Ala Ser Asn Arg Arg Trp Pro Tyr Asn Leu Pro Arg Ser Arg
 370 375 380
 Asn Ile Leu Arg Ala Ser Asp Val Gln Gly Asn Ala Tyr Ile Thr Thr
 385 390 395 400
 Lys Arg Leu Lys Asp Gly Tyr Gln Trp Asp Ile Leu Phe Asn Ser Asn
 405 410 415
 His Lys Gly His Glu Tyr Met Tyr Tyr Trp Phe Gly Leu Pro Ser Asp
 420 425 430
 Gln Thr Pro Thr Gly Pro Val Thr Phe Thr Ile Ile Asn Arg Asp Gly
 435 440 445

AM101548_Staph_Epi.ST25

Ser Ser Thr Ser Thr Gly Gly Val Gly Phe Gly Ser Gly Ala Pro Leu
 450 455 460
 Pro Gln Phe Trp Arg Ser Ala Gly Ala Ile Asn Ser Ser Val Ala Asn
 465 470 475 480
 Asp Phe Lys His Gly Ser Ala Thr Asn Tyr Ala Phe Tyr Asp Gly Val
 485 490 495
 Asn Asn Phe Ser Asp Phe Ala Arg Gly Gly Glu Leu Tyr Phe Asp Arg
 500 505 510
 Glu Gly Ala Thr Gln Thr Asn Lys Tyr Tyr Gly Asp Glu Asn Phe Ala
 515 520 525
 Leu Leu Asn Ser Glu Lys Pro Asp Gln Ile Arg Gly Leu Asp Thr Ile
 530 535 540
 Tyr Ser Phe Lys Gly Ser Gly Asp Val Ser Tyr Arg Ile Ser Phe Lys
 545 550 555 560
 Thr Gln Gly Ala Pro Thr Ala Arg Leu Tyr Tyr Ala Ala Gly Ala Arg
 565 570 575
 Ser Gly Glu Tyr Arg Gln Ala Thr Asn Tyr Asn Gln Leu Tyr Val Glu
 580 585 590
 Pro Tyr Lys Asn Tyr Arg Asn Arg Val Gln Ser Asn Val Gln Val Lys
 595 600 605
 Asn Arg Thr Leu His Leu Lys Arg Thr Ile Arg Gln Phe Asp Pro Thr
 610 615 620
 Leu Gln Arg Thr Thr Asp Val Pro Ile Leu Asp Ser Asp Gly Ser Gly
 625 630 635 640
 Ser Ile Asp Ser Val Tyr Asp Pro Leu Ser Tyr Val Lys Asn Val Thr
 645 650 655
 Gly Thr Val Leu Gly Ile Tyr Pro Ser Tyr Leu Pro Tyr Asn Gln Glu
 660 665 670
 Arg Trp Gln Gly Ala Asn Ala Met Asn Ala Tyr Gln Ile Glu Glu Leu
 675 680 685
 Phe Ser Gln Glu Asn Leu Gln Asn Ala Ala Arg Ser Gly Arg Pro Ile
 690 695 700
 Gln Phe Leu Val Gly Phe Asp Val Glu Asp Ser His His Asn Pro Glu
 Page 48

48

.. ~~00456~~

705		710		AM101548_Staph_Ep1.ST25										715		720
Thr	Leu	Leu	Pro	Val ₇₂₅	Asn	Leu	Tyr	Val	Lys ₇₃₀	Pro	Glu	Leu	Lys	His ₇₃₅	Thr	
Ile	Glu	Leu	Tyr ₇₄₀	His	Asp	Asn	Glu	Lys ₇₄₅	Gln	Asn	Arg	Lys	Glu ₇₅₀	Phe	Ser	
Val	Ser	Lys ₇₅₅	Arg	Ala	Gly	His	Gly ₇₆₀	Val	Phe	Gln	Ile	Met ₇₆₅	Ser	Gly	Thr	
Leu	His ₇₇₀	Asn	Thr	Val	Gly	Ser ₇₇₅	Gly	Ile	Leu	Pro	Tyr ₇₈₀	Gln	Gln	Glu	Ile	
Arg ₇₈₅	Ile	Lys	Leu	Thr	Ser ₇₉₀	Asn	Glu	Pro	Ile	Lys ₇₉₅	Asp	Ser	Glu	Trp	Ser ₈₀₀	
Ile	Thr	Gly	Tyr	Pro ₈₀₅	Asn	Thr	Leu	Thr	Leu ₈₁₀	Gln	Asn	Ala	Val	Gly ₈₁₅	Arg	
Thr	Asn	Asn	Ala ₈₂₀	Thr	Glu	Lys	Asn	Leu ₈₂₅	Ala	Leu	Val	Gly	His ₈₃₀	Ile	Asp	
Pro	Gly	Asn ₈₃₅	Tyr	Phe	Ile	Thr	Val ₈₄₀	Lys	Phe	Gly	Asp	Lys ₈₄₅	Val	Glu	Gln	
Phe	Glu ₈₅₀	Ile	Arg	Ser	Lys	Pro ₈₅₅	Thr	Pro	Pro	Arg	Ile ₈₆₀	Ile	Thr	Thr	Ala	
Asn	Glu	Leu	Arg	Gly	Asn ₈₇₀	Pro	Asn	His	Lys	Pro ₈₇₅	Glu	Ile	Arg	Val	Thr ₈₈₀	
Asp	Ile	Pro	Asn	Asp ₈₈₅	Thr	Thr	Ala	Lys	Ile ₈₉₀	Lys	Leu	Val	Met	Gly ₈₉₅	Gly	
Thr	Asp	Gly	Asp ₉₀₀	His	Asp	Pro	Glu	Ile ₉₀₅	Asn	Pro	Tyr	Thr	Val ₉₁₀	Pro	Glu	
Asn	Tyr	Thr ₉₁₅	Val	Val	Ala	Glu	Ala ₉₂₀	Tyr	His	Asp	Asn	Asp ₉₂₅	Pro	Ser	Lys	
Asn	Gly ₉₃₀	Val	Leu	Thr	Phe	Arg ₉₃₅	Ser	Ser	Asp	Tyr	Leu ₉₄₀	Lys	Asp	Leu	Pro	
Leu	Ser	Gly	Glu	Leu	Lys ₉₅₀	Ala	Ile	Val	Tyr	Tyr ₉₅₅	Asn	Gln	Tyr	Val	Gln ₉₆₀	
Ser	Asn	Phe	Ser	Asn ₉₆₅	Ser	Val	Pro	Phe	Ser ₉₇₀	Ser	Asp	Thr	Thr	Pro	Pro ₉₇₅	

Thr Ile Asn Glu Pro Ala Gly Leu Val His Lys Tyr Tyr Arg Gly Asp
 980 985 990

.. 00157

His Val Glu Ile Thr Leu Pro Val Thr Asp Asn Thr Gly Gly Ser Gly
 995 1000 1005

Leu Arg Asp Val Asn Val Asn Leu Pro Gln Gly Trp Thr Lys Thr
 1010 1015 1020

Phe Thr Ile Asn Pro Asn Asn Asn Thr Glu Gly Thr Leu Lys Leu
 1025 1030 1035

Ile Gly Asn Ile Pro Ser Asn Glu Ala Tyr Asn Thr Thr Tyr His
 1040 1045 1050

Phe Asn Ile Thr Ala Thr Asp Asn Ser Gly Asn Thr Thr Asn Pro
 1055 1060 1065

Ala Lys Thr Phe Ile Leu Asn Val Gly Lys Leu Ala Asp Asp Leu
 1070 1075 1080

Asn Pro Val Gly Leu Ser Arg Asp Gln Leu Gln Leu Val Thr Asp
 1085 1090 1095

Pro Ser Ser Leu Ser Asn Ser Glu Arg Glu Glu Val Lys Arg Lys
 1100 1105 1110

Ile Ser Glu Ala Asn Ala Asn Ile Arg Ser Tyr Leu Leu Gln Asn
 1115 1120 1125

Asn Pro Ile Leu Ala Gly Val Asn Gly Asp Val Thr Phe Tyr Tyr
 1130 1135 1140

Arg Asp Gly Ser Val Asp Val Ile Asp Ala Glu Asn Val Ile Thr
 1145 1150 1155

Tyr Glu Pro Glu Arg Lys Ser Ile Phe Ser Glu Asn Gly Asn Thr
 1160 1165 1170

Asn Lys Lys Glu Ala Val Ile Thr Ile Ala Arg Gly Gln Asn Tyr
 1175 1180 1185

Thr Ile Gly Pro Asn Leu Arg Lys Tyr Phe Ser Leu Ser Asn Gly
 1190 1195 1200

Ser Asp Leu Pro Asn Arg Asp Phe Thr Ser Ile Ser Ala Ile Gly
 1205 1210 1215

Ser Leu Pro Ser Ser Ser Glu Ile Ser Arg Leu Asn Val Gly Asn
 1220 1225 1230

AM101548_Staph_Epi.ST25

Tyr Asn Tyr Arg Val Asn Ala Lys Asn Ala Tyr His Lys Thr Gln
 1235 1240 1245
 Gln Glu Leu Asn Leu Lys Leu Lys Ile Val Glu Val Asn Ala Pro
 1250 1255 1260
 Thr Gly Asn Asn Arg Val Tyr Arg Val Ser Thr Tyr Asn Leu Thr
 1265 1270 1275
 Asn Asp Glu Ile Asn Lys Ile Lys Gln Ala Phe Lys Ala Ala Asn
 1280 1285 1290
 Ser Gly Leu Asn Leu Asn Asp Asn Asp Ile Thr Val Ser Asn Asn
 1295 1300 1305
 Phe Asp His Arg Asn Val Ser Ser Val Thr Val Thr Ile Arg Lys
 1310 1315 1320
 Gly Asp Leu Ile Lys Glu Phe Ser Ser Asn Leu Asn Asn Met Asn
 1325 1330 1335
 Phe Leu Arg Trp Val Asn Ile Arg Asp Asp Tyr Thr Ile Ser Trp
 1340 1345 1350
 Thr Ser Ser Lys Ile Gln Gly Arg Asn Thr Asp Gly Gly Leu Glu
 1355 1360 1365
 Trp Ser Pro Asp His Lys Ser Leu Ile Tyr Lys Tyr Asp Ala Thr
 1370 1375 1380
 Leu Gly Arg Gln Ile Asn Thr Asn Asp Val Leu Thr Leu Leu Gln
 1385 1390 1395
 Ala Thr Ala Lys Asn Ser Asn Leu Arg Ser Asn Ile Asn Ser Asn
 1400 1405 1410
 Glu Lys Gln Leu Ala Glu Arg Gly Ser Asn Gly Tyr Ser Lys Ser
 1415 1420 1425
 Ile Ile Arg Asp Asp Gly Glu Lys Ser Tyr Leu Leu Asn Ser Asn
 1430 1435 1440
 Pro Ile Gln Val Leu Asp Leu Val Glu Pro Asp Asn Gly Tyr Gly
 1445 1450 1455
 Gly Arg Gln Val Ser His Ser Asn Val Ile Tyr Asn Glu Lys Asn
 1460 1465 1470
 Ser Ser Ile Val Asn Gly Gln Val Pro Glu Ala Asn Gly Ala Ser
 1475 1480 1485

nnng

AM101548_Staph_Epl.ST25

. 00159

Ala Phe Asn Ile Asp Lys Val Val Lys Ala Asn Ala Ala Asn Asn
 1490 1495 1500
 Gly Ile Met Gly Val Ile Tyr Lys Ala Gln Leu Tyr Leu Ala Pro
 1505 1510 1515
 Tyr Ser Pro Lys Gly Tyr Ile Glu Lys Leu Gly Gln Asn Leu Ser
 1520 1525 1530
 Asn Thr Asn Asn Val Ile Asn Val Tyr Phe Val Pro Ser Asp Lys
 1535 1540 1545
 Val Asn Pro Ser Ile Thr Val Gly Asn Tyr Asp His His Thr Val
 1550 1555 1560
 Tyr Ser Gly Glu Thr Phe Lys Asn Thr Ile Asn Val Asn Asp Asn
 1565 1570 1575
 Tyr Gly Leu Asn Thr Val Ala Ser Thr Ser Asp Ser Ala Ile Thr
 1580 1585 1590
 Met Thr Arg Asn Asn Asn Glu Leu Val Gly Gln Ala Pro Asn Val
 1595 1600 1605
 Thr Asn Ser Thr Asn Lys Ile Val Lys Val Lys Ala Thr Asp Lys
 1610 1615 1620
 Ser Gly Asn Glu Ser Ile Val Ser Phe Thr Val Asn Ile Lys Pro
 1625 1630 1635
 Leu Asn Glu Lys Tyr Arg Ile Thr Thr Ser Ser Ser Asn Gln Thr
 1640 1645 1650
 Pro Val Arg Ile Ser Asn Ile Gln Asn Asn Ala Asn Leu Ser Ile
 1655 1660 1665
 Glu Asp Gln Asn Arg Val Lys Ser Ser Leu Ser Met Thr Lys Ile
 1670 1675 1680
 Leu Gly Thr Arg Asn Tyr Val Asn Glu Ser Asn Asn Asp Val Arg
 1685 1690 1695
 Ser Gln Val Val Ser Lys Val Asn Arg Ser Gly Asn Asn Ala Thr
 1700 1705 1710
 Val Asn Val Thr Thr Thr Phe Ser Asp Gly Thr Thr Asn Thr Ile
 1715 1720 1725
 Thr Val Pro Val Lys His Val Leu Leu Glu Val Val Pro Thr Thr

00161

Gln Asn Ser Ser Gly Ile Ala Ser Asn Thr Thr Glu Asp Ile Ser
 1985 1990 1995
 Val Phe Ser Glu Asn Ser Asp Gln Val Asn Val Thr Ala Gly Met
 2000 2005 2010
 Gln Ala Lys Asn Asp Gly Ile Lys Ile Ile Lys Gly Thr Asn Tyr
 2015 2020 2025
 Asn Phe Asn Asp Phe Asn Ser Phe Ile Ser Asn Ile Pro Ala His
 2030 2035 2040
 Ser Thr Leu Thr Trp Asn Glu Glu Pro Asn Ser Trp Lys Asn Asn
 2045 2050 2055
 Ile Gly Thr Thr Thr Lys Thr Val Thr Val Thr Leu Pro Asn His
 2060 2065 2070
 Gln Gly Thr Arg Thr Val Asp Ile Pro Ile Thr Ile Tyr Pro Thr
 2075 2080 2085
 Val Thr Ala Lys Asn Pro Val Arg Asp Gln Lys Gly Arg Asn Leu
 2090 2095 2100
 Thr Asn Gly Thr Asp Val Tyr Asn Tyr Ile Ile Phe Glu Asn Asn
 2105 2110 2115
 Asn Arg Leu Gly Gly Thr Ala Ser Trp Lys Asp Asn Arg Gln Pro
 2120 2125 2130
 Asp Lys Asn Ile Ala Gly Val Gln Asn Leu Ile Ala Leu Val Asn
 2135 2140 2145
 Tyr Pro Gly Ile Ser Thr Pro Leu Glu Val Pro Val Lys Val Trp
 2150 2155 2160
 Val Tyr Asn Phe Asp Phe Thr Gln Pro Ile Tyr Lys Ile Gln Val
 2165 2170 2175
 Gly Asp Thr Phe Pro Lys Gly Thr Trp Ala Gly Tyr Tyr Lys His
 2180 2185 2190
 Leu Glu Asn Gly Glu Gly Leu Pro Ile Asp Gly Trp Lys Phe Tyr
 2195 2200 2205
 Trp Asn Gln Gln Ser Thr Gly Thr Thr Ser Asp Gln Trp Gln Ser
 2210 2215 2220
 Leu Ala Tyr Thr Arg Thr Pro Phe Val Lys Thr Gly Thr Tyr Asp
 2225 2230 2235

AM101548_Staph_Epi.ST25

Val Val Asn Pro Ser Asn Trp Gly Val Trp Gln Thr Ser Gln Ser
 2240 2245 2250
 Ala Lys Phe Ile Val Thr Asn Ala Lys Pro Asn Gln Pro Thr Ile
 2255 2260 2265
 Thr Gln Ser Lys Thr Gly Asp Val Thr Val Thr Pro Gly Ala Val
 2270 2275 2280
 Arg Asn Ile Leu Ile Ser Gly Thr Asn Asp Tyr Ile Gln Ala Ser
 2285 2290 2295
 Ala Asp Lys Ile Val Ile Asn Lys Asn Gly Asn Lys Leu Thr Thr
 2300 2305 2310
 Phe Val Lys Asn Asn Asp Gly Arg Trp Thr Val Glu Thr Gly Ser
 2315 2320 2325
 Pro Asp Ile Asn Gly Ile Gly Pro Thr Asn Asn Gly Thr Ala Ile
 2330 2335 2340
 Ser Leu Ser Arg Leu Ala Val Arg Pro Gly Asp Ser Ile Glu Ala
 2345 2350 2355
 Ile Ala Thr Glu Gly Ser Gly Glu Thr Ile Ser Thr Ser Ala Thr
 2360 2365 2370
 Ser Glu Ile Tyr Ile Val Lys Ala Pro Gln Pro Glu Gln Val Ala
 2375 2380 2385
 Thr His Thr Tyr Asp Asn Gly Thr Phe Asp Ile Leu Pro Asp Asn
 2390 2395 2400
 Ser Arg Asn Ser Leu Asn Pro Thr Glu Arg Val Glu Ile Asn Tyr
 2405 2410 2415
 Thr Glu Lys Leu Asn Gly Asn Glu Thr Gln Lys Ser Phe Thr Ile
 2420 2425 2430
 Thr Lys Asn Asn Asn Gly Lys Trp Thr Ile Asn Asn Lys Pro Asn
 2435 2440 2445
 Tyr Val Glu Phe Asn Gln Asp Asn Gly Lys Val Val Phe Ser Ala
 2450 2455 2460
 Asn Thr Ile Lys Pro Asn Ser Gln Ile Thr Ile Thr Pro Lys Ala
 2465 2470 2475
 Gly Gln Gly Asn Thr Glu Asn Thr Asn Pro Thr Val Ile Gln Ala
 2480 2485 2490

. . nntc2

AM101548_Staph_Epf.ST25

. 00153

Pro Ala Gln His Thr Leu Thr Ile Asn Glu Ile Val Lys Glu Gln
 2495 2500 2505
 Gly Gln Asn Val Thr Asn Asp Asp Ile Asn Asn Ala Val Gln Val
 2510 2515 2520
 Pro Asn Lys Asn Arg Val Ala Ile Lys Gln Gly Asn Ala Leu Pro
 2525 2530 2535
 Thr Asn Leu Ala Gly Gly Ser Thr Ser His Ile Pro Val Val Ile
 2540 2545 2550
 Tyr Tyr Ser Asp Gly Ser Ser Glu Glu Ala Thr Glu Thr Val Arg
 2555 2560 2565
 Thr Lys Val Asn Lys Thr Glu Leu Ile Asn Ala Arg Arg Arg Leu
 2570 2575 2580
 Asp Glu Glu Ile Ser Lys Glu Asn Lys Thr Pro Ser Ser Ile Arg
 2585 2590 2595
 Asn Phe Asp Gln Ala Met Asn Arg Ala Gln Ser Gln Ile Asn Thr
 2600 2605 2610
 Ala Lys Ser Asp Ala Asp Gln Val Ile Gly Thr Glu Phe Ala Thr
 2615 2620 2625
 Pro Gln Gln Val Asn Ser Ala Leu Ser Lys Val Gln Ala Ala Gln
 2630 2635 2640
 Asn Lys Ile Asn Glu Ala Lys Ala Leu Leu Gln Asn Lys Ala Asp
 2645 2650 2655
 Asn Ser Gln Leu Val Arg Ala Lys Glu Gln Leu Gln Gln Ser Ile
 2660 2665 2670
 Gln Pro Ala Ala Ser Thr Asp Gly Met Thr Gln Asp Ser Thr Arg
 2675 2680 2685
 Asn Tyr Lys Asn Lys Arg Gln Ala Ala Glu Gln Ala Ile Gln His
 2690 2695 2700
 Ala Asn Ser Val Ile Asn Asn Gly Asp Ala Thr Ser Gln Gln Ile
 2705 2710 2715
 Asn Asp Ala Lys Asn Thr Val Glu Gln Ala Gln Arg Asp Tyr Val
 2720 2725 2730
 Glu Ala Lys Ser Asn Leu Arg Ala Asp Lys Ser Gln Leu Gln Ser
 Page 56

92

~~NOTES~~

AM101548_Staph_Epi.ST25

Ala Ile Asn Met Leu Gln Asn Lys Glu Asn Asn Thr Glu Leu Val
 2990 2995 3000

Asn Ala Lys Asn Arg Leu Glu Asn Ala Val Asn Asp Thr Asp Pro
 3005 3010 3015

Thr His Gly Met Thr Gln Glu Thr Ile Asn Asn Tyr Asn Ala Lys
 3020 3025 3030

Lys Arg Glu Ala Gln Asn Glu Ile Gln Lys Ala Asn Met Ile Ile
 3035 3040 3045

Asn Asn Gly Asp Ala Thr Ala Gln Asp Ile Ser Ser Glu Lys Ser
 3050 3055 3060

Lys Val Glu Gln Val Leu Gln Ala Leu Gln Asn Ala Lys Asn Asp
 3065 3070 3075

Leu Arg Ala Asp Lys Arg Glu Leu Gln Thr Ala Tyr Asn Lys Leu
 3080 3085 3090

Ile Gln Asn Val Asn Thr Asn Gly Lys Lys Pro Ser Ser Ile Gln
 3095 3100 3105

Asn Tyr Lys Ser Ala Arg Arg Asn Ile Glu Asn Gln Tyr Asn Thr
 3110 3115 3120

Ala Lys Asn Glu Ala His Asn Val Leu Glu Asn Thr Asn Pro Thr
 3125 3130 3135

Val Asn Ala Val Glu Asp Ala Leu Arg Lys Ile Asn Ala Ile Gln
 3140 3145 3150

Pro Glu Val Thr Lys Ala Ile Asn Ile Leu Gln Asp Lys Glu Asp
 3155 3160 3165

Asn Ser Glu Leu Val Arg Ala Lys Glu Lys Leu Asp Gln Ala Ile
 3170 3175 3180

Asn Ser Gln Pro Ser Leu Asn Gly Met Thr Gln Glu Ser Ile Asn
 3185 3190 3195

Asn Tyr Thr Thr Lys Arg Arg Glu Ala Gln Asn Ile Ala Ser Ser
 3200 3205 3210

Ala Asp Thr Ile Ile Asn Asn Gly Asp Ala Ser Ile Glu Gln Ile
 3215 3220 3225

Thr Glu Asn Lys Ile Arg Val Glu Glu Ala Thr Asn Ala Leu Asn
 3230 3235 3240

00165

93

AM101548_Staph_Epi.ST25

Glu Ala Lys Gln His Leu Thr Ala Asp Thr Thr Ser Leu Lys Thr
 3245 3250 3255
 Glu Val Arg Lys Leu Ser Arg Arg Gly Asp Thr Asn Asn Lys Lys
 3260 3265 3270
 Pro Ser Ser Val Ser Ala Tyr Asn Asn Thr Ile His Ser Leu Gln
 3275 3280 3285
 Ser Glu Ile Thr Gln Thr Glu Asn Arg Ala Asn Thr Ile Ile Asn
 3290 3295 3300
 Lys Pro Ile Arg Ser Val Glu Glu Val Asn Asn Ala Leu His Glu
 3305 3310 3315
 Val Asn Gln Leu Asn Gln Arg Leu Thr Asp Thr Ile Asn Leu Leu
 3320 3325 3330
 Gln Pro Leu Ala Asn Lys Glu Ser Leu Lys Glu Ala Arg Asn Arg
 3335 3340 3345
 Leu Glu Ser Lys Ile Asn Glu Thr Val Gln Thr Asp Gly Met Thr
 3350 3355 3360
 Gln Gln Ser Val Glu Asn Tyr Lys Gln Ala Lys Ile Lys Ala Gln
 3365 3370 3375
 Asn Glu Ser Ser Ile Ala Gln Thr Leu Ile Asn Asn Gly Asp Ala
 3380 3385 3390
 Ser Asp Gln Glu Val Ser Thr Glu Ile Glu Lys Leu Asn Gln Lys
 3395 3400 3405
 Leu Ser Glu Leu Thr Asn Ser Ile Asn His Leu Thr Val Asn Lys
 3410 3415 3420
 Glu Pro Leu Glu Thr Ala Lys Asn Gln Leu Gln Ala Asn Ile Asp
 3425 3430 3435
 Gln Lys Pro Ser Thr Asp Gly Met Thr Gln Gln Ser Val Gln Ser
 3440 3445 3450
 Tyr Glu Arg Lys Leu Gln Glu Ala Lys Asp Lys Ile Asn Ser Ile
 3455 3460 3465
 Asn Asn Val Leu Ala Asn Asn Pro Asp Val Asn Ala Ile Arg Thr
 3470 3475 3480
 Asn Lys Val Glu Thr Glu Gln Ile Asn Asn Glu Leu Thr Gln Ala
 3485 3490 3495

AM101548_Staph_Epf1.ST25

.a 00157

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

94

AM101548_staph_Epi_ST25

3740 3745 3750

Thr Gly Leu Arg Ala Asp Lys Glu Glu Leu Gln Asn Ala Tyr Asn
 3755 3760 3765

Gln Leu Thr Gln Asn Ile Asp Thr Ser Gly Lys Thr Pro Ala Ser
 3770 3775 3780

Ile Arg Lys Tyr Asn Glu Ala Lys Ser Arg Ile Gln Thr Gln Ile
 3785 3790 3795

Asp Ser Ala Lys Asn Glu Ala Asn Ser Ile Leu Thr Asn Asp Asn
 3800 3805 3810

Pro Gln Val Ser Gln Val Thr Ala Ala Leu Asn Lys Ile Lys Ala
 3815 3820 3825

Val Gln Pro Glu Leu Asp Lys Ala Ile Ala Met Leu Lys Asn Lys
 3830 3835 3840

Glu Asn Asn Asn Ala Leu Val Gln Ala Lys Gln Gln Leu Gln Gln
 3845 3850 3855

Ile Val Asn Glu Val Asp Pro Thr Gln Gly Met Thr Thr Asp Thr
 3860 3865 3870

Ala Asn Asn Tyr Lys Ser Lys Lys Arg Glu Ala Glu Asp Glu Ile
 3875 3880 3885

Gln Lys Ala Gln Gln Ile Ile Asn Asn Gly Asp Ala Thr Glu Gln
 3890 3895 3900

Gln Ile Thr Asn Glu Thr Asn Arg Val Asn Gln Ala Ile Asn Ala
 3905 3910 3915

Ile Asn Lys Ala Lys Asn Asp Leu Arg Ala Asp Lys Ser Gln Leu
 3920 3925 3930

Glu Asn Ala Tyr Asn Gln Leu Ile Gln Asn Val Asp Thr Asn Gly
 3935 3940 3945

Lys Lys Pro Ala Ser Ile Gln Gln Tyr Gln Ala Ala Arg Gln Ala
 3950 3955 3960

Ile Glu Thr Gln Tyr Asn Asn Ala Lys Ser Glu Ala His Gln Ile
 3965 3970 3975

Leu Glu Asn Ser Asn Pro Ser Val Asn Glu Val Ala Gln Ala Leu
 3980 3985 3990

. n n n n

Gln Lys Val Glu Ala Val Gln Leu Lys Val Asn Asp Ala Ile His
 3995 4000 4005
 Ile Leu Gln Asn Lys Asp Asn Asn Ser Ala Leu Val Thr Ala Lys
 4010 4015 4020
 Asn Gln Leu Gln Gln Ser Val Asn Asp Gln Pro Leu Thr Thr Gly
 4025 4030 4035
 Met Thr Gln Asp Ser Ile Asn Asn Tyr Glu Ala Lys Arg Asn Glu
 4040 4045 4050
 Ala Gln Ser Ala Ile Arg Asn Ala Glu Ala Val Ile Asn Asn Gly
 4055 4060 4065
 Asp Ala Thr Ala Lys Gln Ile Ser Asp Glu Lys Ser Lys Val Glu
 4070 4075 4080
 Gln Ala Leu Ala His Leu Asn Asp Ala Lys Gln Gln Leu Thr Ala
 4085 4090 4095
 Asp Thr Thr Glu Leu Gln Thr Ala Val Gln Gln Leu Asn Arg Arg
 4100 4105 4110
 Gly Asp Thr Asn Asn Lys Lys Pro Arg Ser Ile Asn Ala Tyr Asn
 4115 4120 4125
 Lys Ala Ile Gln Ser Leu Glu Thr Gln Ile Thr Ser Ala Lys Asp
 4130 4135 4140
 Asn Ala Asn Ala Val Ile Gln Lys Pro Ile Arg Thr Val Gln Glu
 4145 4150 4155
 Val Asn Asn Ala Leu Gln Gln Val Asn Gln Leu Asn Gln Gln Leu
 4160 4165 4170
 Thr Glu Ala Ile Asn Gln Leu Gln Pro Leu Ser Asn Asn Asp Ala
 4175 4180 4185
 Leu Lys Ala Ala Lys Leu Asn Leu Glu Asn Lys Ile Asn Gln Thr
 4190 4195 4200
 Val Gln Thr Asp Gly Met Thr Gln Gln Ser Ile Glu Ala Tyr Gln
 4205 4210 4215
 Asn Ala Lys Arg Val Ala Gln Asn Glu Ser Asn Thr Ala Leu Ala
 4220 4225 4230
 Leu Ile Asn Asn Gly Asp Ala Asp Glu Gln Gln Ile Thr Thr Glu
 4235 4240 4245

. 00169

95

AM101548_Staph_Epi.ST25

Thr Asp Arg Val Asn Gln Gln Thr Thr Asn Leu Thr Gln Ala Ile
 4250 4255 4260
 Asn Gly Leu Thr Val Asn Lys Glu Pro Leu Glu Thr Ala Lys Thr
 4265 4270 4275
 Ala Leu Gln Asn Asn Ile Asp Gln Val Pro Ser Thr Asp Gly Met
 4280 4285 4290
 Thr Gln Gln Ser Val Ala Asn Tyr Asn Gln Lys Leu Gln Ile Ala
 4295 4300 4305
 Lys Asn Glu Ile Asn Thr Ile Asn Asn Val Leu Ala Asn Asn Pro
 4310 4315 4320
 Asp Val Asn Ala Ile Lys Thr Asn Lys Ala Glu Ala Glu Arg Ile
 4325 4330 4335
 Ser Asn Asp Leu Thr Gln Ala Lys Asn Asn Leu Gln Val Asp Thr
 4340 4345 4350
 Gln Pro Leu Glu Lys Ile Lys Arg Gln Leu Gln Asp Glu Ile Asp
 4355 4360 4365
 Gln Gly Thr Asn Thr Asp Gly Met Thr Gln Asp Ser Val Asp Asn
 4370 4375 4380
 Tyr Asn Asp Ser Leu Ser Ala Ala Ile Ile Glu Lys Gly Lys Val
 4385 4390 4395
 Asn Lys Leu Leu Lys Arg Asn Pro Thr Val Glu Gln Val Lys Glu
 4400 4405 4410
 Ser Val Ala Asn Ala Gln Gln Val Ile Gln Asp Leu Gln Asn Ala
 4415 4420 4425
 Arg Thr Ser Leu Val Pro Asp Lys Thr Gln Leu Gln Glu Ala Lys
 4430 4435 4440
 Asn Arg Leu Glu Asn Ser Ile Asn Gln Gln Thr Asp Thr Asp Gly
 4445 4450 4455
 Met Thr Gln Asp Ser Leu Asn Asn Tyr Asn Asp Lys Leu Ala Lys
 4460 4465 4470
 Ala Arg Gln Asn Leu Glu Lys Ile Ser Lys Val Leu Gly Gly Gln
 4475 4480 4485
 Pro Thr Val Ala Glu Ile Arg Gln Asn Thr Asp Glu Ala Asn Ala
 4490 4495 4500

. 11 00178

AM101548_Staph_Ep1.ST25

..A 00171

His Lys Gln Ala Leu Asp Thr Ala Arg Ser Gln Leu Thr Leu Asn
 4505 4510 4515
 Arg Glu Pro Tyr Ile Asn His Ile Asn Asn Glu Ser His Leu Asn
 4520 4525 4530
 Asn Ala Gln Lys Asp Asn Phe Lys Ala Gln Val Asn Ser Ala Pro
 4535 4540 4545
 Asn His Asn Thr Leu Glu Thr Ile Lys Asn Lys Ala Asp Thr Leu
 4550 4555 4560
 Asn Gln Ser Met Thr Ala Leu Ser Glu Ser Ile Ala Asp Tyr Glu
 4565 4570 4575
 Asn Gln Lys Gln Gln Glu Asn Tyr Leu Asp Ala Ser Asn Asn Lys
 4580 4585 4590
 Arg Gln Asp Tyr Asp Asn Ala Val Asn Ala Ala Lys Gly Ile Leu
 4595 4600 4605
 Asn Gln Thr Gln Ser Pro Thr Met Ser Ala Asp Val Ile Asp Gln
 4610 4615 4620
 Lys Ala Glu Asp Val Lys Arg Thr Lys Thr Ala Leu Asp Gly Asn
 4625 4630 4635
 Gln Arg Leu Glu Val Ala Lys Gln Gln Ala Leu Asn His Leu Asn
 4640 4645 4650
 Thr Leu Asn Asp Leu Asn Asp Ala Gln Arg Gln Thr Leu Thr Asp
 4655 4660 4665
 Thr Ile Asn His Ser Pro Asn Ile Asn Ser Val Asn Gln Ala Lys
 4670 4675 4680
 Glu Lys Ala Asn Thr Val Asn Thr Ala Met Thr Gln Leu Lys Gln
 4685 4690 4695
 Thr Ile Ala Asn Tyr Asp Asp Glu Leu His Asp Gly Asn Tyr Ile
 4700 4705 4710
 Asn Ala Asp Lys Asp Lys Lys Asp Ala Tyr Asn Asn Ala Val Asn
 4715 4720 4725
 Asn Ala Lys Gln Leu Ile Asn Gln Ser Asp Ala Asn Gln Ala Gln
 4730 4735 4740
 Leu Asp Pro Ala Glu Ile Asn Lys Val Thr Gln Arg Val Asn Thr
 Page 64

AM101548_Staph_Epi.ST25

4745 . 4750 4755
 Thr Lys Asn Asp Leu Asn Gly Asn Asp Lys Leu Ala Glu Ala Lys
 4760 4765 4770
 Arg Asp Ala Asn Thr Thr Ile Asp Gly Leu Thr Tyr Leu Asn Glu
 4775 4780 4785
 Ala Gln Arg Asn Lys Ala Lys Glu Asn Val Gly Lys Ala Ser Thr
 4790 4795 4800
 Lys Thr Asn Ile Thr Ser Gln Leu Gln Asp Tyr Asn Gln Leu Asn
 4805 4810 4815
 Ile Ala Met Gln Ala Leu Arg Asn Ser Val Asn Asp Val Asn Asn
 4820 4825 4830
 Val Lys Ala Asn Ser Asn Tyr Ile Asn Glu Asp Asn Gly Pro Lys
 4835 4840 4845
 Glu Ala Tyr Asn Gln Ala Val Thr His Ala Gln Thr Leu Ile Asn
 4850 4855 4860
 Ala Gln Ser Asn Pro Glu Met Ser Arg Asp Val Val Asn Gln Lys
 4865 4870 4875
 Thr Gln Ala Val Asn Thr Ala His Gln Asn Leu His Gly Gln Gln
 4880 4885 4890
 Lys Leu Glu Gln Ala Gln Ser Ser Ala Asn Thr Glu Ile Gly Asn
 4895 4900 4905
 Leu Pro Asn Leu Thr Asn Thr Gln Lys Ala Lys Glu Lys Glu Leu
 4910 4915 4920
 Val Asn Ser Lys Gln Thr Arg Thr Glu Val Gln Glu Gln Leu Asn
 4925 4930 4935
 Gln Ala Lys Ser Leu Asp Ser Ser Met Gly Thr Leu Lys Ser Leu
 4940 4945 4950
 Val Ala Lys Gln Pro Thr Val Gln Lys Thr Ser Val Tyr Ile Asn
 4955 4960 4965
 Glu Asp Gln Pro Glu Gln Ser Ala Tyr Asn Asp Ser Ile Thr Met
 4970 4975 4980
 Gly Gln Thr Ile Ile Asn Lys Thr Ala Asp Pro Val Leu Asp Lys
 4985 4990 4995

. 0022

AM101548_Staph_Epl.5725

Thr Leu Val Asp Asn Ala Ile Ser Asn Ile Ser Thr Lys Glu Asn
5000 5005 5010

Ala Leu His Gly Glu Gln Lys Leu Thr Thr Ala Lys Thr Glu Ala
5015 5020 5025

Ile Asn Ala Leu Asn Thr Leu Ala Asp Leu Asn Thr Pro Gln Lys
5030 5035 5040

Glu Ala Ile Lys Thr Ala Ile Asn Thr Ala His Thr Arg Thr Asp
5045 5050 5055

Val Thr Ala Glu Gln Ser Lys Ala Asn Gln Ile Asn Ser Ala Met
5060 5065 5070

His Thr Leu Arg Gln Asn Ile Ser Asp Asn Glu Ser Val Thr Asn
5075 5080 5085

Glu Ser Asn Tyr Ile Asn Ala Glu Pro Glu Lys Gln His Ala Phe
5090 5095 5100

Thr Glu Ala Leu Asn Asn Ala Lys Glu Ile Val Asn Glu Gln Gln
5105 5110 5115

Ala Thr Leu Asp Ala Asn Ser Ile Asn Gln Lys Ala Gln Ala Ile
5120 5125 5130

Leu Thr Thr Lys Asn Ala Leu Asp Gly Glu Glu Gln Leu Arg Arg
5135 5140 5145

Ala Lys Glu Asn Ala Asp Gln Glu Ile Asn Thr Leu Asn Gln Leu
5150 5155 5160

Thr Asp Ala Gln Arg Asn Ser Glu Lys Gly Leu Val Asn Ser Ser
5165 5170 5175

Gln Thr Arg Thr Glu Val Ala Ser Gln Leu Ala Lys Ala Lys Glu
5180 5185 5190

Leu Asn Lys Val Met Glu Gln Leu Asn His Leu Ile Asn Gly Lys
5195 5200 5205

Asn Gln Met Ile Asn Ser Ser Lys Phe Ile Asn Glu Asp Ala Asn
5210 5215 5220

Gln Gln Gln Ala Tyr Ser Asn Ala Ile Ala Ser Ala Glu Ala Leu
5225 5230 5235

Lys Asn Lys Ser Gln Asn Pro Glu Leu Asp Lys Val Thr Ile Glu
5240 5245 5250

.n 00173

97

AM101548_Staph_Epl.ST25

Gln Ala Ile Asn Asn Ile Asn Ser Ala Ile Asn Asn Leu Asn Gly
 5255 5260 5265
 Glu Ala Lys Leu Thr Lys Ala Lys Glu Asp Ala Val Ala Ser Ile
 5270 5275 5280
 Asn Asn Leu Ser Gly Leu Thr Asn Glu Gln Lys Thr Lys Glu Asn
 5285 5290 5295
 Gln Ala Val Asn Gly Ala Gln Thr Arg Asp Gln Val Ala Asn Lys
 5300 5305 5310
 Leu Arg Asp Ala Glu Ala Leu Asp Gln Ser Met Gln Thr Leu Arg
 5315 5320 5325
 Asp Leu Val Asn Asn Gln Asn Ala Ile His Ser Thr Ser Asn Tyr
 5330 5335 5340
 Phe Asn Glu Asp Ser Thr Gln Lys Asn Thr Tyr Asp Asn Ala Ile
 5345 5350 5355
 Asp Asn Gly Ser Thr Tyr Ile Thr Gly Gln His Asn Pro Glu Leu
 5360 5365 5370
 Asn Lys Ser Thr Ile Asp Gln Thr Ile Ser Arg Ile Asn Thr Ala
 5375 5380 5385
 Lys Asn Asp Leu His Gly Val Glu Lys Leu Gln Arg Asp Lys Gly
 5390 5395 5400
 Thr Ala Asn Gln Glu Ile Gly Gln Leu Gly Tyr Leu Asn Asp Pro
 5405 5410 5415
 Gln Lys Ser Gly Glu Glu Ser Leu Val Asn Gly Ser Asn Thr Arg
 5420 5425 5430
 Ser Glu Val Glu Glu His Leu Asn Glu Ala Lys Ser Leu Asn Asn
 5435 5440 5445
 Ala Met Lys Gln Leu Arg Asp Lys Val Ala Glu Lys Thr Asn Val
 5450 5455 5460
 Lys Gln Ser Ser Asp Tyr Ile Asn Asp Ser Thr Glu His Gln Arg
 5465 5470 5475
 Gly Tyr Asp Gln Ala Leu Gln Glu Ala Glu Asn Ile Ile Asn Glu
 5480 5485 5490
 Ile Gly Asn Pro Thr Leu Asn Lys Ser Glu Ile Glu Gln Lys Leu
 5495 5500 5505

AM101548_Staph_Epl.ST25

. 00175

Gln Gln Leu Thr Asp Ala Gln Asn Ala Leu Gln Gly Ser His Leu
 5510 5515 5520
 Leu Glu Glu Ala Lys Asn Asn Ala Ile Thr Gly Ile Asn Lys Leu
 5525 5530 5535
 Thr Ala Leu Asn Asp Ala Gln Arg Gln Lys Ala Ile Glu Asn Val
 5540 5545 5550
 Gln Ala Gln Gln Thr Ile Pro Ala Val Asn Gln Gln Leu Thr Leu
 5555 5560 5565
 Asp Arg Glu Ile Asn Thr Ala Met Gln Ala Leu Arg Asp Lys Val
 5570 5575 5580
 Gly Gln Gln Asn Asn Val His Gln Gln Ser Asn Tyr Phe Asn Glu
 5585 5590 5595
 Asp Glu Gln Pro Lys His Asn Tyr Asp Asn Ser Val Gln Ala Gly
 5600 5605 5610
 Gln Thr Ile Ile Asp Lys Leu Gln Asp Pro Ile Met Asn Lys Asn
 5615 5620 5625
 Glu Ile Glu Gln Ala Ile Asn Gln Ile Asn Thr Thr Gln Thr Ala
 5630 5635 5640
 Leu Ser Gly Glu Asn Lys Leu His Thr Asp Gln Glu Ser Thr Asn
 5645 5650 5655
 Arg Gln Ile Glu Gly Leu Ser Ser Leu Asn Thr Ala Gln Ile Asn
 5660 5665 5670
 Ala Glu Lys Asp Leu Val Asn Gln Ala Lys Thr Arg Thr Asp Val
 5675 5680 5685
 Ala Gln Lys Leu Ala Ala Ala Lys Glu Ile Asn Ser Ala Met Ser
 5690 5695 5700
 Asn Leu Arg Asp Gly Ile Gln Asn Lys Glu Asp Ile Lys Arg Ser
 5705 5710 5715
 Ser Ala Tyr Ile Asn Ala Asp Pro Thr Lys Val Thr Ala Tyr Asp
 5720 5725 5730
 Gln Ala Leu Gln Asn Ala Glu Asn Ile Ile Asn Ala Thr Pro Asn
 5735 5740 5745
 Val Glu Leu Asn Lys Ala Thr Ile Glu Gln Ala Leu Ser Arg Val

98

AM101548_Staph_Epi.ST25

5750 5755 5760

Gln Gln Ala Gln Gln Asp Leu Asp Gly Val Gln Gln Leu Ala Asn
5765 5770 5775

Ala Lys Gln Gln Ala Thr Gln Thr Val Asn Gly Leu Asn Ser Leu
5780 5785 5790

Asn Asp Gly Gln Lys Arg Glu Leu Asn Leu Leu Ile Asn Ser Ala
5795 5800 5805

Asn Thr Arg Thr Lys Val Gln Glu Glu Leu Asn Lys Ala Thr Glu
5810 5815 5820

Leu Asn His Ala Met Glu Ala Leu Arg Asn Ser Val Gln Asn Val
5825 5830 5835

Asp Gln Val Lys Gln Ser Ser Asn Tyr Val Asn Glu Asp Gln Pro
5840 5845 5850

Glu Gln His Asn Tyr Asp Asn Ala Val Asn Glu Ala Gln Ala Thr
5855 5860 5865

Ile Asn Asn Asn Ala Gln Pro Val Leu Asp Lys Leu Ala Ile Glu
5870 5875 5880

Arg Leu Thr Gln Thr Val Asn Thr Thr Lys Asp Ala Leu His Gly
5885 5890 5895

Ala Gln Lys Leu Thr Gln Asp Gln Gln Ala Ala Glu Thr Gly Ile
5900 5905 5910

Arg Gly Leu Thr Ser Leu Asn Glu Pro Gln Lys Asn Ala Glu Val
5915 5920 5925

Ala Lys Val Thr Ala Ala Thr Thr Arg Asp Glu Val Arg Asn Ile
5930 5935 5940

Arg Gln Glu Ala Thr Thr Leu Asp Thr Ala Met Leu Gly Leu Arg
5945 5950 5955

Lys Ser Ile Lys Asp Lys Asn Asp Thr Lys Asn Ser Ser Lys Tyr
5960 5965 5970

Ile Asn Glu Asp His Asp Gln Gln Gln Ala Tyr Asp Asn Ala Val
5975 5980 5985

Asn Asn Ala Gln Gln Val Ile Asp Glu Thr Gln Ala Thr Leu Ser
5990 5995 6000

00125

. 00177

AM101548_Staph_Epl.ST25

Ser Asp Thr Ile Asn Gln Leu Ala Asn Ala Val Thr Gln Ala Lys
6005 6010 6015

Ser Asn Leu His Gly Asp Thr Lys Leu Gln His Asp Lys Asp Ser
6020 6025 6030

Ala Lys Gln Thr Ile Ala Gln Leu Gln Asn Leu Asn Ser Ala Gln
6035 6040 6045

Lys His Met Glu Asp Ser Leu Ile Asp Asn Glu Ser Thr Arg Thr
6050 6055 6060

Gln Val Gln His Asp Leu Thr Glu Ala Gln Ala Leu Asp Gly Leu
6065 6070 6075

Met Gly Ala Leu Lys Glu Ser Ile Lys Asp Tyr Thr Asn Ile Val
6080 6085 6090

Ser Asn Gly Asn Tyr Ile Asn Ala Glu Pro Ser Lys Lys Gln Ala
6095 6100 6105

Tyr Asp Ala Ala Val Gln Asn Ala Gln Asn Ile Ile Asn Gly Thr
6110 6115 6120

Asn Gln Pro Thr Ile Asn Lys Gly Asn Val Thr Thr Ala Thr Gln
6125 6130 6135

Thr Val Lys Asn Thr Lys Asp Ala Leu Asp Gly Asp His Arg Leu
6140 6145 6150

Glu Glu Ala Lys Asn Asn Ala Asn Gln Thr Ile Arg Asn Leu Ser
6155 6160 6165

Asn Leu Asn Asn Ala Gln Lys Asp Ala Glu Lys Asn Leu Val Asn
6170 6175 6180

Ser Ala Ser Thr Leu Glu Gln Val Gln Gln Asn Leu Gln Thr Ala
6185 6190 6195

Gln Gln Leu Asp Asn Ala Met Gly Glu Leu Arg Gln Ser Ile Ala
6200 6205 6210

Lys Lys Asp Gln Val Lys Ala Asp Ser Lys Tyr Leu Asn Glu Asp
6215 6220 6225

Pro Gln Ile Lys Gln Asn Tyr Asp Asp Ala Val Gln Arg Val Glu
6230 6235 6240

Thr Ile Ile Asn Glu Thr Gln Asn Pro Glu Leu Leu Lys Ala Asn
6245 6250 6255

99

AM101548_Staph_Epi.ST25

Ile Asp Gln Ala Thr Gln Ser Val Gln Asn Ala Glu Gln Ala Leu
 6260 6265 6270
 His Gly Ala Glu Lys Leu Asn Gln Asp Lys Gln Thr Ser Ser Thr
 6275 6280 6285
 Glu Leu Asp Gly Leu Thr Asp Leu Thr Asp Ala Gln Arg Glu Lys
 6290 6295 6300
 Leu Arg Glu Gln Ile Asn Thr Ser Asn Ser Arg Asp Asp Ile Lys
 6305 6310 6315
 Gln Lys Ile Glu Gln Ala Lys Ala Leu Asn Asp Ala Met Lys Lys
 6320 6325 6330
 Leu Lys Glu Gln Val Ala Gln Lys Asp Gly Val His Ala Asn Ser
 6335 6340 6345
 Asp Tyr Thr Asn Glu Asp Ser Ala Gln Lys Asp Ala Tyr Asn Asn
 6350 6355 6360
 Ala Leu Lys Gln Ala Glu Asp Ile Ile Asn Asn Ser Ser Asn Pro
 6365 6370 6375
 Asn Leu Asn Ala Gln Asp Ile Thr Asn Ala Leu Asn Asn Ile Lys
 6380 6385 6390
 Gln Ala Gln Asp Asn Leu His Gly Ala Gln Lys Leu Gln Gln Asp
 6395 6400 6405
 Lys Asn Thr Thr Asn Gln Ala Ile Gly Asn Leu Asn His Leu Asn
 6410 6415 6420
 Gln Pro Gln Lys Asp Ala Leu Ile Gln Ala Ile Asn Gly Ala Thr
 6425 6430 6435
 Ser Arg Asp Gln Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu Ala Glu Ala Leu
 6440 6445 6450
 Asp Glu Ala Met Lys Gln Leu Glu Asp Gln Val Asn Gln Asp Asp
 6455 6460 6465
 Gln Ile Ser Asn Ser Ser Pro Phe Ile Asn Glu Asp Ser Asp Lys
 6470 6475 6480
 Gln Lys Thr Tyr Asn Asp Lys Ile Gln Ala Ala Lys Glu Ile Ile
 6485 6490 6495
 Asn Gln Thr Ser Asn Pro Thr Leu Asp Lys Gln Lys Ile Ala Asp
 6500 6505 6510

nn178

AM101548_Staph_Epi.ST25

. 00179

Thr Leu Gln Asn Ile Lys Asp Ala Val Asn Asn Leu His Gly Asp
 6515 6520 6525
 Gln Lys Leu Ala Gln Ser Lys Gln Asp Ala Asn Asn Gln Leu Asn
 6530 6535 6540
 His Leu Asp Asp Leu Thr Glu Glu Gln Lys Asn His Phe Lys Pro
 6545 6550 6555
 Leu Ile Asn Asn Ala Asp Thr Arg Asp Glu Val Asn Lys Gln Leu
 6560 6565 6570
 Glu Ile Ala Lys Gln Leu Asn Gly Asp Met Ser Thr Leu His Lys
 6575 6580 6585
 Val Ile Asn Asp Lys Asp Gln Ile Gln His Leu Ser Asn Tyr Ile
 6590 6595 6600
 Asn Ala Asp Asn Asp Lys Lys Gln Asn Tyr Asp Asn Ala Ile Lys
 6605 6610 6615
 Glu Ala Glu Asp Leu Ile His Asn His Pro Asp Thr Leu Asp His
 6620 6625 6630
 Lys Ala Leu Gln Asp Leu Leu Asn Lys Ile Asp Gln Ala His Asn
 6635 6640 6645
 Glu Leu Asn Gly Glu Ser Arg Phe Lys Gln Ala Leu Asp Asn Ala
 6650 6655 6660
 Leu Asn Asp Ile Asp Ser Leu Asn Ser Leu Asn Val Pro Gln Arg
 6665 6670 6675
 Gln Thr Val Lys Asp Asn Ile Asn His Val Thr Thr Leu Glu Ser
 6680 6685 6690
 Leu Ala Gln Glu Leu Gln Lys Ala Lys Glu Leu Asn Asp Ala Met
 6695 6700 6705
 Lys Ala Met Arg Asp Ser Ile Met Asn Gln Glu Gln Ile Arg Lys
 6710 6715 6720
 Asn Ser Asn Tyr Thr Asn Glu Asp Leu Ala Gln Gln Asn Ala Tyr
 6725 6730 6735
 Asn His Ala Val Asp Lys Ile Asn Asn Ile Ile Gly Glu Asp Asn
 6740 6745 6750
 Ala Thr Met Asp Pro Gln Ile Ile Lys Gln Ala Thr Gln Asp Ile

AM101548_Staph_Epi.ST25

6755 6760 6765

Asn Thr Ala Ile Asn Gly Leu Asn Gly Asp Gln Lys Leu Gln Asp
6770 6775 6780

Ala Lys Thr Asp Ala Lys Gln Gln Ile Thr Asn Phe Thr Gly Leu
6785 6790 6795

Thr Glu Pro Gln Lys Gln Ala Leu Glu Asn Ile Ile Asn Gln Gln
6800 6805 6810

Thr Ser Arg Ala Asn Val Ala Lys Gln Leu Ser His Ala Lys Phe
6815 6820 6825

Leu Asn Gly Lys Met Glu Glu Leu Lys Val Ala Val Ala Lys Ala
6830 6835 6840

Ser Leu Val Arg Gln Asn Ser Asn Tyr Ile Asn Glu Asp Val Ser
6845 6850 6855

Glu Lys Glu Ala Tyr Glu Gln Ala Ile Ala Lys Gly Gln Glu Ile
6860 6865 6870

Ile Asn Ser Glu Asn Asn Pro Thr Ile Ser Ser Thr Asp Ile Asn
6875 6880 6885

Arg Thr Ile Gln Glu Ile Asn Asp Ala Glu Gln Asn Leu His Gly
6890 6895 6900

Asp Asn Lys Leu Arg Gln Ala Gln Glu Ile Ala Lys Asn Glu Ile
6905 6910 6915

Gln Asn Leu Asp Gly Leu Asn Ser Ala Gln Ile Thr Lys Leu Ile
6920 6925 6930

Gln Asp Ile Gly Arg Thr Thr Thr Lys Pro Ala Val Thr Gln Lys
6935 6940 6945

Leu Glu Glu Ala Lys Ala Ile Asn Gln Ala Met Gln Gln Leu Lys
6950 6955 6960

Gln Ser Ile Ala Asp Lys Asp Ala Thr Leu Asn Ser Ser Asn Tyr
6965 6970 6975

Leu Asn Glu Asp Ser Glu Lys Lys Leu Ala Tyr Asp Asn Ala Val
6980 6985 6990

Ser Gln Ala Glu Gln Leu Ile Asn Gln Leu Asn Asp Pro Thr Met
6995 7000 7005

. 00141

Asp Ile Ser Asn Ile Gln Ala Ile Thr Gln Lys Val Ile Gln Ala
 7010 7015 7020
 Lys Asp Ser Leu His Gly Ala Asn Lys Leu Ala Gln Asn Gln Ala
 7025 7030 7035
 Asp Ser Asn Leu Ile Ile Asn Gln Ser Thr Asn Leu Asn Asp Lys
 7040 7045 7050
 Gln Lys Gln Ala Leu Asn Asp Leu Ile Asn His Ala Gln Thr Lys
 7055 7060 7065
 Gln Gln Val Ala Glu Ile Ile Ala Gln Ala Asn Lys Leu Asn Asn
 7070 7075 7080
 Glu Met Gly Thr Leu Lys Thr Leu Val Glu Glu Gln Ser Asn Val
 7085 7090 7095
 His Gln Gln Ser Lys Tyr Ile Asn Glu Asp Pro Gln Val Gln Asn
 7100 7105 7110
 Ile Tyr Asn Asp Ser Ile Gln Lys Gly Arg Glu Ile Leu Asn Gly
 7115 7120 7125
 Thr Thr Asp Asp Val Leu Asn Asn Asn Lys Ile Ala Asp Ala Ile
 7130 7135 7140
 Gln Asn Ile His Leu Thr Lys Asn Asp Leu His Gly Asp Gln Lys
 7145 7150 7155
 Leu Gln Lys Ala Gln Gln Asp Ala Thr Asn Glu Leu Asn Tyr Leu
 7160 7165 7170
 Thr Asn Leu Asn Asn Ser Gln Arg Gln Ser Glu His Asp Glu Ile
 7175 7180 7185
 Asn Ser Ala Pro Ser Arg Thr Glu Val Ser Asn Asp Leu Asn His
 7190 7195 7200
 Ala Lys Ala Leu Asn Glu Ala Met Arg Gln Leu Glu Asn Glu Val
 7205 7210 7215
 Ala Leu Glu Asn Ser Val Lys Lys Leu Ser Asp Phe Ile Asn Glu
 7220 7225 7230
 Asp Glu Ala Ala Gln Asn Glu Tyr Ser Asn Ala Leu Gln Lys Ala
 7235 7240 7245
 Lys Asp Ile Ile Asn Gly Val Pro Ser Ser Thr Leu Asp Lys Ala
 7250 7255 7260

101

AM101548_Staph_Epi.ST25

Thr Ile Glu Asp Ala Leu Leu Glu Leu Gln Asn Ala Arg Glu Ser
 7265 7270 7275
 Leu His Gly Glu Gln Lys Leu Gln Glu Ala Lys Asn Gln Ala Val
 7280 7285 7290
 Ala Glu Ile Asp Asn Leu Gln Ala Leu Asn Pro Gly Gln Val Leu
 7295 7300 7305
 Ala Glu Lys Thr Leu Val Asn Gln Ala Ser Thr Lys Pro Glu Val
 7310 7315 7320
 Gln Glu Ala Leu Gln Lys Ala Lys Glu Leu Asn Glu Ala Met Lys
 7325 7330 7335
 Ala Leu Lys Thr Glu Ile Asn Lys Lys Glu Gln Ile Lys Ala Asp
 7340 7345 7350
 Ser Arg Tyr Val Asn Ala Asp Ser Gly Leu Gln Ala Asn Tyr Asn
 7355 7360 7365
 Ser Ala Leu Asn Tyr Gly Ser Gln Ile Ile Ala Thr Thr Gln Pro
 7370 7375 7380
 Pro Glu Leu Asn Lys Asp Val Ile Asn Arg Ala Thr Gln Thr Ile
 7385 7390 7395
 Lys Thr Ala Glu Asn Asn Leu Asn Gly Gln Ser Lys Leu Ala Glu
 7400 7405 7410
 Ala Lys Ser Asp Gly Asn Gln Ser Ile Glu His Leu Gln Gly Leu
 7415 7420 7425
 Thr Gln Ser Gln Lys Asp Lys Gln His Asp Leu Ile Asn Gln Ala
 7430 7435 7440
 Gln Thr Lys Gln Gln Val Asp Asp Ile Val Asn Asn Ser Lys Gln
 7445 7450 7455
 Leu Asp Asn Ser Met Asn Gln Leu Gln Gln Ile Val Asn Asn Asp
 7460 7465 7470
 Asn Thr Val Lys Gln Asn Ser Asp Phe Ile Asn Glu Asp Ser Ser
 7475 7480 7485
 Gln Gln Asp Ala Tyr Asn His Ala Ile Gln Ala Ala Lys Asp Leu
 7490 7495 7500
 Ile Thr Ala His Pro Thr Ile Met Asp Lys Asn Gln Ile Asp Gln
 7505 7510 7515

nnn2

AM101548_Staph_Epi.ST25

. 00183

Ala Ile Glu Asn Ile Lys Gln Ala Leu Asn Asp Leu His Gly Ser
 7520 7525 7530
 Asn Lys Leu Ser Glu Asp Lys Lys Glu Ala Ser Glu Gln Leu Gln
 7535 7540 7545
 Asn Leu Asn Ser Leu Thr Asn Gly Gln Lys Asp Thr Ile Leu Asn
 7550 7555 7560
 His Ile Phe Ser Ala Pro Thr Arg Ser Gln Val Gly Glu Lys Ile
 7565 7570 7575
 Ala Ser Ala Lys Gln Leu Asn Asn Thr Met Lys Ala Leu Arg Asp
 7580 7585 7590
 Ser Ile Ala Asp Asn Asn Glu Ile Leu Gln Ser Ser Lys Tyr Phe
 7595 7600 7605
 Asn Glu Asp Ser Glu Gln Gln Asn Ala Tyr Asn Gln Ala Val Asn
 7610 7615 7620
 Lys Ala Lys Asn Ile Ile Asn Asp Gln Pro Thr Pro Val Met Ala
 7625 7630 7635
 Asn Asp Glu Ile Gln Ser Val Leu Asn Glu Val Lys Gln Thr Lys
 7640 7645 7650
 Asp Asn Leu His Gly Asp Gln Lys Leu Ala Asn Asp Lys Thr Asp
 7655 7660 7665
 Ala Gln Ala Thr Leu Asn Ala Leu Asn Tyr Leu Asn Gln Ala Gln
 7670 7675 7680
 Arg Gly Asn Leu Glu Thr Lys Val Gln Asn Ser Asn Ser Arg Pro
 7685 7690 7695
 Glu Val Gln Lys Val Val Gln Leu Ala Asn Gln Leu Asn Asp Ala
 7700 7705 7710
 Met Lys Lys Leu Asp Asp Ala Leu Thr Gly Asn Asp Ala Ile Lys
 7715 7720 7725
 Gln Thr Ser Asn Tyr Ile Asn Glu Asp Thr Ser Gln Gln Val Asn
 7730 7735 7740
 Phe Asp Glu Tyr Thr Asp Arg Gly Lys Asn Ile Val Ala Glu Gln
 7745 7750 7755
 Thr Asn Pro Asn Met Ser Pro Thr Asn Ile Asn Thr Ile Ala Asp
 Page 76

402

AM101548_Staph_Epi_ST25

7760 7765 7770

Lys Ile Thr Glu Ala Lys Asn Asp Leu His Gly Val Gln Lys Leu
7775 7780 7785

Glu Gln Ala Gln Gln Gln Ser Ile Asn Thr Ile Asn Gln Met Thr
7790 7795 7800

Gly Leu Asn Gln Ala Gln Lys Glu Gln Leu Asn Gln Glu Ile Gln
7805 7810 7815

Gln Thr Gln Thr Arg Ser Glu Val His Gln Val Ile Lys Lys Ala
7820 7825 7830

Gln Ala Leu Asn Asp Ser Met Asn Thr Leu Arg Gln Ser Ile Thr
7835 7840 7845

Asp Glu Asn Glu Val Lys Gln Thr Ser Asn Tyr Ile Asn Glu Thr
7850 7855 7860

Val Gly Asn Gln Thr Ala Tyr Asn Asn Ala Val Asp Arg Val Lys
7865 7870 7875

Gln Ile Ile Asn Gln Thr Ser Asn Pro Thr Met Asn Pro Leu Glu
7880 7885 7890

Val Glu Arg Ala Thr Ser Asn Val Lys Thr Ser Lys Asp Ala Leu
7895 7900 7905

His Gly Glu Arg Glu Leu Asn Asp Asn Lys Asn Ser Lys Thr Phe
7910 7915 7920

Ala Val Asn His Leu Asp Asn Leu Asn Gln Ala Gln Lys Glu Ala
7925 7930 7935

Leu Thr His Glu Ile Glu Gln Ala Thr Ile Val Ser Gln Val Asn
7940 7945 7950

Asn Ile Tyr Asn Lys Ala Lys Ala Leu Asn Asn Asp Met Lys Lys
7955 7960 7965

Leu Lys Asp Ile Val Ala Gln Gln Asp Asn Val Arg Gln Ser Asn
7970 7975 7980

Asn Tyr Ile Asn Glu Asp Ser Thr Pro Gln Asn Met Tyr Asn Asp
7985 7990 7995

Thr Ile Asn His Ala Gln Ser Ile Ile Asp Gln Val Ala Asn Pro
8000 8005 8010

AM101548_Staph_Ep1.ST25

Thr Met Ser His Asp Glu Ile Glu Asn Ala Ile Asn Asn Ile Lys
8015 8020 8025

His Ala Ile Asn Ala Leu Asp Gly Glu His Lys Leu Gln Gln Ala
8030 8035 8040

Lys Glu Asn Ala Asn Leu Leu Ile Asn Ser Leu Asn Asp Leu Asn
8045 8050 8055

Ala Pro Gln Arg Asp Ala Ile Asn Arg Leu Val Asn Glu Ala Gln
8060 8065 8070

Thr Arg Glu Lys Val Ala Glu Gln Leu Gln Ser Ala Gln Ala Leu
8075 8080 8085

Asn Asp Ala Met Lys His Leu Arg Asn Ser Ile Gln Asn Gln Ser
8090 8095 8100

Ser Val Arg Gln Glu Ser Lys Tyr Ile Asn Ala Ser Asp Ala Lys
8105 8110 8115

Lys Glu Gln Tyr Asn His Ala Val Arg Glu Val Glu Asn Ile Ile
8120 8125 8130

Asn Glu Gln His Pro Thr Leu Asp Lys Glu Ile Ile Lys Gln Leu
8135 8140 8145

Thr Asp Ala Val Asn Gln Ala Asn Asn Asp Leu Asn Gly Val Glu
8150 8155 8160

Leu Leu Asp Ala Asp Lys Gln Asn Ala His Gln Ser Ile Pro Thr
8165 8170 8175

Leu Met His Leu Asn Gln Ala Gln Gln Asn Ala Leu Asn Glu Lys
8180 8185 8190

Ile Asn Asn Ala Val Thr Arg Ala Glu Val Ala Ala Ile Ile Gly
8195 8200 8205

Gln Ala Lys Ile Leu Asp His Ala Met Glu Asn Leu Glu Glu Ser
8210 8215 8220

Ile Lys Asp Lys Glu Gln Val Lys Gln Ser Ser Asn Tyr Ile Asn
8225 8230 8235

Glu Asp Pro Asp Val Gln Glu Thr Tyr Asn Asn Ala Val Asp His
8240 8245 8250

Val Thr Glu Ile Leu Asn Gln Thr Val Asn Pro Thr Leu Ser Ile
8255 8260 8265

nn185

AM101548_Staph_Epi.ST25

Glu Asp Ile Glu His Ala Ile Asn Glu Val Asn Gln Ala Lys Lys
 8270 8275 8280
 Gln Leu Arg Gly Lys Gln Lys Leu Tyr Gln Thr Ile Asp Leu Ala
 8285 8290 8295
 Asp Lys Glu Leu Ser Lys Leu Asp Asp Leu Thr Ser Gln Gln Ser
 8300 8305 8310
 Ser Ser Ile Ser Asn Gln Ile Tyr Thr Ala Lys Thr Arg Thr Glu
 8315 8320 8325
 Val Ala Gln Ala Ile Glu Lys Ala Lys Ser Leu Asn His Ala Met
 8330 8335 8340
 Lys Ala Leu Asn Lys Val Tyr Lys Asn Thr Asp Lys Val Leu Asp
 8345 8350 8355
 Ser Ser Arg Phe Ile Asn Glu Asp Gln Pro Glu Lys Glu Ala Tyr
 8360 8365 8370
 Gln Gln Ala Ile Asn His Val Asp Ser Ile Ile His Arg Gln Thr
 8375 8380 8385
 Asn Pro Glu Met Asp Pro Thr Val Ile Asn Ser Ile Thr His Glu
 8390 8395 8400
 Leu Glu Thr Ala Gln Asn Asn Leu His Gly Asp Gln Lys Leu Ala
 8405 8410 8415
 His Ala Gln Gln Asp Ala Ala Asn Val Ile Asn Gly Leu Ile His
 8420 8425 8430
 Leu Asn Val Ala Gln Arg Glu Val Met Ile Asn Ala Asn Thr Asn
 8435 8440 8445
 Ala Thr Thr Arg Glu Lys Val Ala Lys Asn Leu Asp Asn Ala Gln
 8450 8455 8460
 Ala Leu Asp Lys Ala Met Glu Thr Leu Gln Gln Val Val Ala His
 8465 8470 8475
 Lys Asn Asn Ile Leu Asn Asp Ser Lys Tyr Leu Asn Glu Asp Ser
 8480 8485 8490
 Lys Tyr Gln Gln Gln Tyr Asp Arg Val Val Ala Asp Ala Glu Gln
 8495 8500 8505
 Leu Leu Asn Gln Thr Thr Asn Pro Thr Leu Glu Pro Tyr Lys Ile
 8510 8515 8520

... 00106

.. 00147

AM101548_Staph_Epi.ST25

Asp Ile Val Lys Asp Asn Val Leu Ala Asn Glu Lys Ile Leu Phe
 8525 8530 8535
 Gly Ala Glu Lys Leu Ser Tyr Asp Lys Ser Asn Ala Asn Asp Glu
 8540 8545 8550
 Ile Lys His Met Asn Tyr Leu Asn Asn Ala Gln Lys Gln Ser Ile
 8555 8560
 Lys Asp Met Ile Ser His Ala Ala Leu Arg Thr Glu Val Lys Gln
 8570 8575 8580
 Leu Leu Gln Gln Ala Lys Thr Leu Asp Glu Ala Met Lys Ser Leu
 8585 8590 8595
 Glu Asp Lys Thr Gln Val Val Ile Thr Asp Thr Thr Leu Ser Asn
 8600 8605 8610
 Tyr Thr Glu Ala Ser Glu Asp Lys Lys Glu Lys Val Asp Gln Thr
 8615 8620 8625
 Val Ser His Ala Gln Ala Ile Ile Asp Lys Ile Asn Gly Ser Asn
 8630 8635 8640
 Val Ser Leu Asp Gln Val Arg Gln Ala Leu Glu Gln Leu Thr Gln
 8645 8650 8655
 Ala Ser Glu Asn Leu Asp Gly Asp Gln Arg Val Glu Glu Ala Lys
 8660 8665 8670
 Val His Ala Asn Gln Thr Ile Asp Gln Leu Thr His Leu Asn Ser
 8675 8680 8685
 Leu Gln Gln Gln Thr Ala Lys Glu Ser Val Lys Asn Ala Thr Lys
 8690 8695 8700
 Leu Glu Glu Ile Ala Thr Ala Ser Asn Asp Ala Leu Ala Leu Asn
 8705 8710 8715
 Lys Val Met Gly Lys Leu Glu Gln Phe Ile Asn His Ala Asp Ser
 8720 8725 8730
 Val Glu Asn Ser Asp Asn Tyr Arg Gln Ala Asp Asp Asp Lys Ile
 8735 8740 8745
 Ile Ala Tyr Asp Asp Ala Leu Glu His Gly Gln Asp Ile Gln Lys
 8750 8755 8760
 Ser Asn Ala Thr Gln Asn Glu Ala Lys Gln Ala Leu Gln Gln Leu
 Page 80

104

AM101548_Staph_Ep1.ST25

8765
 Ile Asn Ala Glu Thr Ser Leu Asn Gly Phe Glu Arg Leu Asn His
 8780 8785 8790
 Ala Arg Pro Arg Ala Leu Glu Tyr Ile Lys Ser Leu Glu Lys Ile
 8795 8800
 Asn Asn Ala Gln Lys Ser Ala Leu Glu Asp Lys Val Thr Gln Ser
 8810 8815 8820
 His Asp Leu Leu Glu Leu Glu His Leu Val Asn Glu Gly Thr Asn
 8825 8830 8835
 Leu Asn Asp Ile Met Gly Glu Leu Ala Asn Ala Ile Val Asn Asn
 8840 8845 8850
 Tyr Ala Pro Thr Lys Ala Ser Ile Asn Tyr Ile Asn Ala Asp Asn
 8855 8860
 Leu Arg Lys Asp Asn Phe Thr Gln Ala Ile Asn Asn Ala Arg Asp
 8870 8875 8880
 Ala Leu Asn Lys Thr Gln Gly Gln Asn Leu Asp Phe Asn Ala Ile
 8885 8890 8895
 Asp Thr Phe Lys Asp Asp Ile Phe Lys Thr Lys Asp Ala Leu Asn
 8900 8905 8910
 Gly Ile Glu Arg Leu Thr Ala Ala Lys Ser Lys Ala Glu Lys Leu
 8915 8920 8925
 Ile Asp Ser Leu Lys Phe Ile Asn Lys Ala Gln Phe Thr His Ala
 8930 8935 8940
 Asn Asp Glu Ile Met Asn Thr Asn Ser Ile Ala Gln Leu Ser Arg
 8945 8950 8955
 Ile Val Asn Gln Ala Phe Asp Leu Asn Asp Ala Met Lys Ser Leu
 8960 8965 8970
 Arg Asp Glu Leu Asn Asn Lys Ala Phe Pro Val Gln Ala Ser Ser
 8975 8980 8985
 Asn Tyr Ile Asn Ser Asp Glu Asp Leu Lys Gln Gln Phe Asp His
 8990 8995 9000
 Ala Leu Ser Asn Ala Arg Lys Val Leu Ala Lys Glu Asn Gly Lys
 9005 9010 9015

. * n n 1 2 3

Asn Leu Asp Glu Ile Gln Ile Glu Gly Leu Lys Gln Val Ile Glu
 9020 9025 9030
 Asp Thr Lys Asp Ala Leu Asn Gly Ile Gln Arg Leu Ser Lys Ala
 9035 9040 9045
 Lys Ala Lys Ala Ile Gln Tyr Val Gln Ser Leu Ser Tyr Ile Asn
 9050 9055 9060
 Asp Ala Gln Arg His Ile Ala Glu Asn Asn Ile His Asn Ser Asp
 9065 9070 9075
 Asp Leu Ser Ser Leu Ala Asn Thr Leu Ser Lys Ala Ser Asp Leu
 9080 9085 9090
 Asp Asn Ala Met Lys Asp Leu Arg Asp Thr Leu Glu Ser Asn Ser
 9095 9100 9105
 Thr Ser Val Pro Asn Ser Val Asn Tyr Ile Asn Ala Asp Lys Asn
 9110 9115 9120
 Phe Gln Ile Glu Phe Asp Glu Ala Leu Gln Gln Ala Ser Ala Thr
 9125 9130 9135
 Ser Ser Lys Thr Ser Glu Asn Pro Ala Thr Ile Glu Glu Val Leu
 9140 9145 9150
 Gly Leu Ser Gln Ala Ile Tyr Asp Thr Lys Asn Ala Leu Asn Gly
 9155 9160 9165
 Glu Gln Arg Leu Ala Thr Glu Lys Ser Lys Asp Leu Lys Leu Ile
 9170 9175 9180
 Lys Gly Leu Lys Asp Leu Asn Lys Ala Gln Leu Glu Asp Val Thr
 9185 9190 9195
 Asn Lys Val Asn Ser Ala Asn Thr Leu Thr Glu Leu Ser Gln Leu
 9200 9205 9210
 Thr Gln Ser Thr Leu Lys Leu Asn Asp Lys Met Lys Leu Leu Arg
 9215 9220 9225
 Asp Lys Leu Lys Thr Leu Val Asn Pro Val Lys Ala Ser Leu Asn
 9230 9235 9240
 Tyr Arg Asn Ala Asp Tyr Asn Leu Lys Arg Gln Phe Asn Lys Ala
 9245 9250 9255
 Leu Lys Glu Ala Lys Gly Ile Leu Asn Lys Asn Ser Gly Pro Asn
 9260 9265 9270

. 00189

AM101548_Staph_Ep1.ST25

Val Asn Ile Asn Asp Ile Gln His Leu Leu Thr Gln Ile Asp Asn
9275 9280 9285

Ala Lys Asp Gln Leu Asn Gly Glu Arg Arg Leu Lys Glu His Gln
9290 9295 9300

Gln Lys Ser Glu Val Phe Ile Ile Lys Glu Leu Asp Ile Leu Asn
9305 9310 9315

Asn Ala Gln Lys Ala Ala Ile Ile Asn Gln Ile Arg Ala Ser Lys
9320 9325 9330

Asp Ile Lys Ile Ile Asn Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Glu Leu
9335 9340 9345

Asn Asp Ala Met Gln Gly Leu Lys Glu His Val Ala Gln Leu Thr
9350 9355 9360

Ala Thr Thr Lys Asp Asn Ile Glu Tyr Leu Asn Ala Asp Glu Asp
9365 9370 9375

Leu Lys Leu Gln Tyr Asp Tyr Ala Ile Asn Leu Ala Asn Asn Val
9380 9385 9390

Leu Asp Lys Glu Asn Gly Thr Asn Lys Asp Ala Asn Ile Ile Ile
9395 9400 9405

Gly Met Ile Gln Asn Met Asp Asp Ala Arg Ala Leu Leu Asn Gly
9410 9415 9420

Ile Glu Arg Leu Lys Asp Ala Gln Thr Lys Ala His Asn Asp Ile
9425 9430 9435

Lys Asp Thr Leu Lys Arg Gln Leu Asp Glu Ile Glu His Ala Asn
9440 9445 9450

Ala Thr Ser Asn Ser Lys Ala Gln Ala Lys Gln Met Val Asn Glu
9455 9460 9465

Glu Ala Arg Lys Ala Phe Ser Asn Ile Asn His Ala Thr Ser Asn
9470 9475 9480

Asp Leu Val Asn Gln Ala Lys Asp Glu Gly Gln Ser Ala Ile Glu
9485 9490 9495

His Ile His Ala Asp Glu Leu Pro Lys Ala Lys Leu Asp Ala Asn
9500 9505 9510

Gln Met Ile Asp Gln Lys Val Glu Asp Ile Asn His Leu Ile Ser
9515 9520 9525

. 00191

AM101548_Staph_Epi.ST25

Gln Asn Pro Asn Leu Ser His Asp Glu Lys Asn Lys Leu Ile Ser
 9530 9535 9540
 Gln Ile Asn Lys Leu Val Asn Gly Ile Lys Asp Glu Ile Gln Gln
 9545 9550 9555
 Ala Ile Asn Lys Gln Gln Ile Glu Asn Ala Thr Thr Lys Leu Asp
 9560 9565 9570
 Glu Val Ile Glu Thr Thr Lys Lys Leu Ile Ile Ala Lys Ala Glu
 9575 9580 9585
 Ala Lys Gln Val Ile Lys Glu Leu Ser Gln Lys Lys Arg Asp Ala
 9590 9595 9600
 Ile Asn Asn Asn Thr Asp Leu Thr Pro Ser Gln Lys Ala His Ala
 9605 9610 9615
 Leu Ala Asp Ile Asp Lys Thr Glu Lys Asp Ala Leu Gln His Ile
 9620 9625 9630
 Glu Asn Ser Asn Ser Ile Asp Asp Ile Asn Asn Asn Lys Lys His
 9635 9640 9645
 Ala Phe Asn Thr Leu Ala His Ile Ile Ile Trp Asp Thr Asp Gln
 9650 9655 9660
 Gln Pro Leu Val Phe Glu Leu Pro Glu Leu Ser Leu Gln Asn Ala
 9665 9670 9675
 Leu Val Thr Ser Glu Val Val Val His Arg Asp Glu Thr Ile Ser
 9680 9685 9690
 Leu Glu Ser Ile Ile Gly Ala Met Thr Leu Thr Asp Glu Leu Lys
 9695 9700 9705
 Val Asn Ile Val Ser Leu Pro Asn Thr Asp Lys Val Ala Asp His
 9710 9715 9720
 Leu Thr Ala Lys Val Lys Val Ile Leu Ala Asp Gly Ser Tyr Val
 9725 9730 9735
 Thr Val Asn Val Pro Val Lys Val Val Glu Lys Glu Leu Gln Ile
 9740 9745 9750
 Ala Lys Lys Asp Ala Ile Lys Thr Ile Asp Val Leu Val Lys Gln
 9755 9760 9765
 Lys Ile Lys Asp Ile Asp Ser Asn Asn Glu Leu Thr Ser Thr Gln
 Page 84

AM101548_Staph_Epi.ST25

9770 9775 9780
 Arg Glu Asp Ala Lys Ala Glu Ile Glu Arg Leu Lys Lys Gln Ala
 9785 9790 9795
 Ile Asp Lys Val Asn His Ser Lys Ser Ile Lys Asp Ile Glu Thr
 9800 9805 9810
 Val Lys Arg Thr Asp Phe Glu Glu Ile Asp Gln Phe Asp Pro Lys
 9815 9820 9825
 Arg Phe Thr Leu Asn Lys Ala Lys Lys Asp Ile Ile Thr Asp Val
 9830 9835 9840
 Asn Thr Gln Ile Gln Asn Gly Phe Lys Glu Ile Glu Thr Ile Lys
 9845 9850 9855
 Gly Leu Thr Ser Asn Glu Lys Thr Gln Phe Asp Lys Gln Leu Thr
 9860 9865 9870
 Glu Leu Gln Lys Glu Phe Leu Glu Lys Val Glu His Ala His Asn
 9875 9880 9885
 Leu Val Glu Leu Asn Gln Leu Gln Gln Glu Phe Asn Asn Arg Tyr
 9890 9895 9900
 Lys His Ile Leu Asn Gln Ala His Leu Leu Gly Glu Lys His Ile
 9905 9910 9915
 Ala Glu His Lys Leu Gly Tyr Val Val Val Asn Lys Thr Gln Gln
 9920 9925 9930
 Ile Leu Asn Asn Gln Ser Ala Ser Tyr Phe Ile Lys Gln Trp Ala
 9935 9940 9945
 Leu Asp Arg Ile Lys Gln Ile Gln Leu Glu Thr Met Asn Ser Ile
 9950 9955 9960
 Arg Gly Ala His Thr Val Gln Asp Val His Lys Ala Leu Leu Gln
 9965 9970 9975
 Gly Ile Glu Gln Ile Leu Lys Val Asn Val Ser Ile Ile Asn Gln
 9980 9985 9990
 Ser Phe Asn Asp Ser Leu His Asn Phe Asn Tyr Leu His Ser Lys
 9995 10000 10005
 Phe Asp Ala Arg Leu Arg Glu Lys Asp Val Ala Asn His Ile Val
 10010 10015 10020

nn 102

nn1q3

AM101548_Staph_Epl.ST25
Gln Thr Glu Thr Phe Lys Glu Val Leu Lys Gly Thr Gly val Glu
10025 10030 10035
Pro Gly Lys Ile Asn Lys Glu Thr Gln Gln Pro Lys Leu His Lys
10040 10045 10050
Asn Asp Asn Asp Ser Leu Phe Lys His Leu Val Asp Asn Phe Gly
10055 10060 10065
Lys Thr Val Gly Val Ile Thr Leu Thr Gly Leu Leu Ser Ser Phe
10070 10075 10080
Trp Leu Val Leu Ala Lys Arg Arg Lys Lys Glu Glu Glu Glu Lys
10085 10090 10095
Gln Ser Ile Lys Asn His His Lys Asp Ile Arg Leu Ser Asp Thr
10100 10105 10110
Asp Lys Ile Asp Pro Ile Val Ile Thr Lys Arg Lys Ile Asp Lys
10115 10120 10125
Glu Glu Gln Ile Gln Asn Asp Asp Lys His Ser Ile Pro Val Ala
10130 10135 10140
Lys His Lys Lys Ser Lys Glu Lys Gln Leu Ser Glu Glu Asp Ile
10145 10150 10155
His Ser Ile Pro Val Val Lys Arg Lys Gln Asn Ser Asp Asn Lys
10160 10165 10170
Asp Thr Lys Gln Lys Lys Val Thr Ser Lys Lys Lys Lys Thr Pro
10175 10180 10185
Gln Ser Thr Lys Lys Val Val Lys Thr Lys Lys Arg Ser Lys Lys
10190 10195 10200

<210> 33
<211> 1014
<212> DNA
<213> Staphylococcus epidermidis

<400> 33
ttgcgaaaag acgtgataga agtggttaat aaagttgaag attactactt taaaagttat 60
ccaattcaat acaatccaat aattgaatat ttttaaccaa ttaaaaataa aaaagtaatt 120
gtgtcattaa aaatatataa ggtttataaa aaaattgtgg aaaatattca tgatactgaa 180
agtcaatgga tatattctcc tgaacatgca ttacacccaa tagaatttat agaatcattt 240
tgtaaacata taaagggaaa gtatgctgga acaccaattg aattagaatt atggcaaaaa 300
gcaggaatag caactatitt tggtttcatt aataaaaaaa ctaaagaaag aaaatatcaa 360
gaaatctttt ggggtggtggc tcgtaaaaat ggtaagtcaa ctatatctag tggaatagcg 420
Page 86

AM101548_Staph_Epi.ST25

ttatatattgc tcggtgctga tgggtgaagggt ggcccagaag tatacacagt ggctaccaaa	480
aaagatcaag caaaaatagt atggaacgat gctaaaaaga tgggtgaataa atcgccgtta	540
ttaaaactcg atttcgtaac taaagtagct gagatattaa caccttttaa tgatggacaa	600
ttaattcccc ttggtcgaga tagtgatact acagatgggt taaatgtaca tggtgctatt	660
atggatgaag tgcattgcttg gaaaacaatg caaatgtacg atgtgggttt tgacggaata	720
tctgcacgtg ataattccttt aattctagca ataactactg cgggaacaat aagaaactct	780
gtgtatgata tadaatatga agaatacagaa aatataatca atgggttatg ggaagatgaa	840
ggatataaaa atgaacgatt ttacacctttg atatatgaat tagattcacg agaagaatgg	900
atagatgaaa gttgttggct aaaagccaat ccaggattag gttcaataaa gaaaatagat	960
gctatcaaaa ctaaagtaaa tagagctaag aagaatgctt tatttagagc aacc	1014

<210> 34
 <211> 930
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus epidermidis

<400> 34	
gtgaaaaaaa ttctcgcttt agcaatagca tttttaatta tccttgccgc atgtgggaat	60
cacagtaacc atgaacatca ctcacatgaa ggaaaattaa aagttgtaac tacaactct	120
atttcttatg acatgggttaa acgtgtcpgt ggaaataagg tcgatgttca tagcatcgtt	180
ccagtaggac aagatccaca tgaatatgag gttaaaccta aagatattaa agcattaaca	240
gatgctgacg ttgtatttta taatgggtta aacctagaaa ctggaaatgg ttggtttgaa	300
aaagcacttg accaagcagg aaaatcaaca aaagataaaa atgtgatagc agcatcaaat	360
aatgttaaac caatatactt aatgggtgag gaaggttaaca aaaacaaaca agatccacat	420
gcatgggttaa gttagagaa tggaaattaaa 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 caagggtacac ctggtcaaat gaaaacaagcc	720
attaaatttg ttaaagataa tcattttaaa cattttattag tcgaaacaag cgtagataaa	780
aaagctatgc aaagtttatc agaagaaact aagaaagata tttatggtga agtatttacc	840
gactctatag gtaaggcagg tactaaagggt gactcatact ataaaatgat gaaatcta	900
attgatacaa tacatggtag tatgaaataa	930

<210> 35
 <211> 1131
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus epidermidis
 <400> 35

* nn1q5

AM101548_Staph_Epi.ST25

ttggaggtag ataatatgaa aattgggatt cctaaagaaa taaagaataa tgagaatcga	60
gtgggggttat cccaagtgg tgtacatgca cttgtagacc aaggacatga agtttttagta	120
gaaacaaatg ctggtctagg atcttacttt gaagatgggtg attatcaaga agccgggtgcc	180
aaaattgttg atgagcagtc aaaagcttgg gatgttgata tpgtcatcaa agttaaagaa	240
ccacttgaat cggaatacaa attcttttaa gaagagttaa tcttatttac ttatttacac	300
cttgcaatg aacagaaatt aactcaggca cttgtggaca acaaggttat atctattgcc	360
tatgaaactg tacaattacc agacggttct ttaccgttat taacaccaat gagtgaagtg	420
gctggtagaa tgtctacaca agtgggagct gaatttttac aaagatttaa tggagggtatg	480
ggtatcttac taggtggcat acctggagta cctaaaggca aagtcactat cattpgtgggt	540
ggtcaagcag gtacaaatgc agctaagata gctttaggat tgggagctga agtgacaata	600
ctagatgtta atcctaaccg tttagaagaa ttagaggact tatttgatgg cagagtaaga	660
acaattatgt ctaatccatt aaatatagaa atgtatgtga aagaaagcga tttagtgtt	720
ggagcagtc ttattccagg tgctaaagct ccaaacttag tgactgaaga tatgataaaa	780
gaaatgaaag atggatcagt gattgtagat attgcatag atcaagggtg aatttttgaa	840
acaactgata agattactac tcatgataat ccgacttaca ctaaactgg tgcgtgcat	900
tatgctgtag ctaatatgcc aggtgccgtt ccacgtacat ctacaattgg attgaacaat	960
gcaacattac cttatgcgca attattggct aataaagggt atcgtgaagc atttaaagta	1020
aatcatccat tatctctagg tctgaataca ttaaatggac atgtgactaa taagaatgta	1080
gctgatacat ttaattttga atacacttca attgaagatg cattgaaata a	1131

<210> 36
 <211> 1203
 <212> DNA
 <213> *Staphylococcus epidermidis*

<400> 36	
atggaagcga tgcatacatg tccaaacaaa tattcaacta taaggagagt ttttaataatg	60
aataaaaaaa cgcaaatgat acatggggga catacgacag acaactatac tggagcagtg	120
acaacaccta tttatcaaac aagtacttat ttacaagatg atattggtga ttttaagacaa	180
gggtacgaat attcacgtac tgcaaatcct acacgtgcgt ctcttgaaag tgttattgct	240
aatttagaac atggttaagca tggttttgct tttggttcag gaatggcagc aattagtgc	300
gttatcatgt tattagataa aggagatcac ttagttctta attctgatgt ttatggtggc	360
acatatcgtg cattaactaa agtatttact cgctttggta tagacgtaga ttttgttgat	420
acaactaaaa ttgaaaacat tgaacaatat attaaacctg aaactaaaat gttatatgta	480
gaaacacctt caaatccatt attgcgtgtg actgatatta aagcatcagc aaaaattgca	540
aaaaaatatg atttgatatc tgtagtcgat aatacattta tgacacctta ctaccaaaac	600
cctttagact ttggtattga tatcgtattg cattcggcta ctaaatatat tggaggccat	660

AM101548_Staph_Epi.ST25

agtgatgttg tagctgggtct tgttgctact gctgatgatg atttagcaga acgtctaggg	720
tttatttcaa attctacagg tgggtgtactt ggacctcaag atagctattt attaatacaga	780
gggtattaaaa cgctaggtct aagaatggag caaataaacc gaaacgttga aggtattgtg	840
caaatgttac aaaagcacc taaagttcaa caagtattcc atcctagtat taaggaacat	900
atgaactata ctatccatca aaatcaagca actgggcata caggggtagt atcttttgaa	960
gttaaagata cagaagcggc taaacaagtg attcacgcaa caaactactt tacactggca	1020
gagagttagt gggcagttga aagtctaatt tctgtaccgg cacttatgac gcatgcgtcc	1080
atcccatcag atgtaagagc caaggaaggt attacggatg gtctcattcg tttatctatt	1140
gggtattgaag acacagaaga cttagttaat gatttagaac aagccttaa tactttgaga	1200
taa	1203

<210> 37
 <211> 633
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus epidermidis

<400> 37	
ttggaactac aattagccat tgatttatta aataaagaag aagcagcaaa attagctcaa	60
aaagttagaag aatatgtaga tattgttgaa attggtacgc caattgtaat taatgaaggg	120
ttacctgcag ttcaacattt aaatgaaaat attaataatg cttaaagtatt agctgacttg	180
aaaattatgg atgcagcaga ttacgaagtg agccaagcag taaaatatgg tgcagatatt	240
gttacaattt taggtgttgc tgaagatgct tcaattaaag cagcagttga agaagcgcac	300
aaacatggaa aagcattgct tgttgatatg atagcagtcg aaaacttaga acaacgtgct	360
aaagaactag atgagatggg tgcagactat atcgcagttc atacaggtta cgacttacia	420
gctgaaggaa aatctccatt agacagcttg cgtacagtta aatctgttat caaaaactct	480
aaggttgcag tagcaggtgg tattaacca gatactatca aagatattgt tgctgaagat	540
ccagatttag ttattgttgg tggcgggtatt gcgaatgctg acgatcctgt agaagcagca	600
aaacaatgta gagcagctat tgaaggtaaa taa	633

<210> 38
 <211> 714
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus epidermidis

<400> 38	
atgacaaaat taaatgttaa agtgtttgcg gatggtgcag atattgaaga aatgaaatca	60
gcatataaga atcaactcgt tgatgggtttt acaacgaatc caagcttgat ggctaaagcg	120
gggtgtaactg attataaagc ttttgcagag gaagtgggta gtgaaatacc agacgcttca	180
atttcttttg aggtgtttgc tgacgattta cctactatgg aaaaagaagc tgagatttta	240
aaacaatatg gtgataatgt atttgtaaaa attcctattg ttacaacaac tgggtgagtct	300
acactaccat taattaaacg tttatcatcg aaacaggtaa gggtgaatgt cacggctgtc	360

AM101548_Staph_Epi.ST25

. n0197

tatactatag agcaagtaaa agcaattact gacgctgtaa ctgaagggtgt gccaacatat 420
 gtgtcagtat ttgcaggacg cattgcagat actgggggttg atccacttcc tttgatgaaa 480
 gaatcagtta aggtaactca tagtaagaa ggcgttcaat tattatgggc aagttgtcgt 540
 gaagtatata atgtaatcca agctgatgaa attggagctg atattattac ttgccagct 600
 gatgttgtaa aaaagggttaa taacaattta ggccgggata taggagaact ttcagtagat 660
 acagtcaaag gttttgccaa agacattcaa agttccggtt tgtcaatttt ataa 714

<210> 39
 <211> 795
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus epidermidis

<400> 39
 gtgaatatat tgaaaatcca aatacttcaa ttcaatgtag aacgtggaaa tgttgataaa 60
 aatatgcaaa atatcaaac taagttaaat caatacttag ataaagatac cagtgtcgtc 120
 gtgcttccag aaatgtggaa taacggttat gcattagaag aattagaaca aaaagctgat 180
 aaaaatctta aagacagctc tctctttata aaagacttag cacatacatt taatgtagat 240
 atcattgcag gttcagtatc aaatataaga gaaaaccata tatataatac tgcttttgca 300
 attaataaaa acaaagaatt gattaatgaa tatgacaaag tacatctcgt gccaatgtta 360
 cgtgagccag actttttatg tgggtgaaat gtagtccctg aaccttttta tttatctgat 420
 caaacacttg tgacgcaaat cttttgttat gacttacgat ttccagagat attgcgctat 480
 ccagctagaa aagggtgctaa aattgctttt tatgtagcac agtggcctag ctcaagacta 540
 gatcattggt tatcattact aaaagcgaga gcaatcgaaa atgatatttt tattgtagct 600
 tgtaatagtt gtggtgatga tgggtcacacc aattatgctg gaaattcaat tgtcattaat 660
 cctaattggtg aaatttttagg ccatttagat gataaagaag gtgtactaac aacacatatac 720
 gatgtagact tagtagatca acaaagagaa tatattccag ttttcagaaa tctaaaacca 780
 catctttata aatag 795

<210> 40
 <211> 888
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus epidermidis

<400> 40
 atgtctaaaa tagtaggatac agatcgagtt aaaagaggaa tggctgaaat gcaaaaaggc 60
 ggtgtcatta tggacgtcgt taatgcagaa caagctaaaa ttgctgaaga agccggagct 120
 gttgccgtaa tggcattaga gcgtgtacca tcagatattc gtgctgctgg cgggtgttgca 180
 cgtatggcga atcctaaaat agttgaagaa gttatgaatg ccgtatcaat tccggttatg 240
 gctaaagcca gaattggtca tattacagaa gctagagttt tagaatcgat ggggtgttgac 300
 tatatagatg agtctgaagt attaacgcct gcagacgaag aatatcattt aagaaaagat 360

nn+ag

AM101548_Staph_Ep1.ST25

caatttacag ttccttttgt gtgtggctgt cgtaacttag gtgaagcagc acgacgcatt 420
 ggtgaagggtg cggcgatggt gcgtacgaaa ggtgaacctg gtactggtaa tattgttgaa 480
 gctgtccgtc atatgagacg tgttaattct gaagttagcc gcttaacagt tatgaatgat 540
 gatgaaatta tgacatttgc aaaagatttg ggtgcacctt atgaagtatt aaaacaaatt 600
 aaagataatg gacgtcttcc tgtagttaat tttgcagctg gtggtgttgc tacgcctcag 660
 gatgcagcac taatgatgga attaggtgca gatggtgtat ttgttggttc aggtatatatt 720
 aaatctgaag atcctgaaaa atttgctaaa gctatcgttc aagctacaac acattatcaa 780
 gattatgagt taatcggaaa attggctagt gagctaggta cggctatgaa aggtctagat 840
 attaatcaaa tttcactaga agaaagaatg caagagcgtg gttggtaa 888

<210> 41
 <211> 1746
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus epidermidis

<400> 41
 atggaggatg ctgtgggtgga gatggatgct gttaaatact taaataaatt gaatttagat 60
 aacattgagt taacaaaata tttgtttttt actggtaaag gcggcgtagg taaaacgacg 120
 atatcaagtt ttattgcttt aaacttagca gagaatggaa agaaagtagc tttagtaagt 180
 actgatccag ctagtaattt acaagatgta tttcaaatgg aattatctaa taaattaact 240
 aaatatcaac ctatacctaa tctctctata gccaattttg acccgattgt tgctgcagac 300
 gattataaag cacaatctat agaaccttat gagggatttc taccagaaga tgtgctttct 360
 gaaatgaaag aacagttaag tgggtcatgt acagttgaag tagcagcatt taatgaattt 420
 acaaattttt tatccgataa aacttttagaa caagaatttg atttcattat atttgataca 480
 gctcccacag gtcacacctt gagaatgctt gaattacctt ctgcatggac agattattta 540
 aatacaacga gtaatgacgc ttcttgctta ggtcaattat caggtttaaa tgaaaataga 600
 gttaaatata attcagcact tgaaaaacta cgtaaccaag atgatacgac catgatgtta 660
 gttgcgagac ctactcactc ttctatatat gaaattcaaa gagcgcaaca agaattacaa 720
 caactgtcaa tttctaaatt caaagtaatc attaacaact atatagaaga aagtcacggt 780
 ttaatttcga gtcagatgaa atcagaacaa gataaaaaca ttaatcattt tactgaatgg 840
 ttaaataaca atcatgctta ttacgttcca tataaaaatc agaaagaaga aggtatagaa 900
 agtttaacta atctattaaa tgatgataac ttaattgaaa atgatgactt tattgttgaa 960
 gatcatccgc aattcaataa attaatcgat gaaattgaaa atagtaaagt tcaatattta 1020
 ttacaatgg gaaaagggtg cgttggtaaa acgacagtag caacgcaatt agctacaacg 1080
 ttatctaata aaggatatcg tgttctttta gcaactactg accctactaa agaaattaat 1140
 gttgaaacta caagtaattt aaatactgct tatattgatg aagaacaagc attagaaaag 1200
 tataaaaaag aagtactagc cacagtgaat gatgatacac cacaagacga tattgattat 1260

. 00109

AM101548_Staph_Epi.ST25
attatggaag atttaaaatc accttgtaca gaagaaatag catttttcaa agccttttagt 1320
gacattatgg agaatcaaga cgacatggat tacgtcattg tagatacagc tcctacaggc 1380
cataccttgc tgttacttga ttctagtga aatcatcata gagaattaaa gaaaaaatca 1440
actcaaacta ccagtaatgt tgaaacatta ttacccaaaa ttcaaaataa aaatttaaca 1500
cagatgataa ttgttaacatt agcagaaaaa acaccttatt tagaatctaa acgttttagta 1560
gaagatttaa atagagctaa tataggccat aattgggtggg ttgttaatca atcgtttagtt 1620
acgctaaatc aacgtgatga ctttttttagt aacaaaaaag aagatgaatc attttggata 1680
aacaagatta aaaatgaaag tcttgataat tactttgtca taccttatcg agtattagaa 1740
tattga 1746

<210> 42
<211> 1011
<212> DNA
<213> Staphylococcus epidermidis

<400> 42
atggcaatta aagtagcaat taatggtttt ggtagaattg gtcgttttagc attcagaaga 60
attcaagatg tagaaggctc tgaagtagtt gcagttaacg acttaacaga tgacgatatg 120
ttagctcatt tattaataa cgatactatg caaggctcgtt tcaactggaga agttgaagtt 180
atcgaagggtg gattccgtgt gaacggtaaa gaaattaaat cattcgatga accagatgct 240
ggtaattac catggggcga tttagatatc gacgtagtat tagaatgtac tggtttctat 300
actgataaag aaaaagcaca agctcacatc gatgcagggtg ctaaaaaagt attaattctca 360
gctccagcta aagggtgatgt aaaaacaatc gtattcaaca ctaaccatga tacattagat 420
ggttcagaaa cagttgtttc aggtgcttct tgtactacta actcattagc accagttgca 480
aaagttttta gtagcgaatt cggtttagtt gaaggtttca tgactacaat tcacgcttac 540
actggtgacc aaaatacaca agacgcacct cacagaaaag gtgacaaacg tcgtgcacgt 600
gcagcagctg aaaatattat ccctaactca acaggtgctg ctaaagctat cggtaaagtt 660
attccagaaa tcgatggtaa attagacggt ggagcacaac gtgttccagt tgctactggg 720
tctttaactg aattaactgt agtattagac aaacaagatg taactgttga ccaagttaac 780
agtgttatga aacaagcttc tgacgaatca ttcggttaca ctgaagacga aatcgatatc 840
tctgatattg ttggtatgac ttacggttca ttatttgatg cgactcaaac tcgtgttatg 900
actgttggag atcgtcaatt agttaagtt gcagcttggg acgacaatga aatgtcttac 960
actgctcaat tagtacgtac attagctcac ttagctgaac tttctaaata a 1011

<210> 43
<211> 1305
<212> DNA
<213> Staphylococcus epidermidis

<400> 43
atgccaatta ttacagatgt ttacgctcgc gaagtcttag actcacgtgg taaccaaca 60

140

nn 99

AM101548_Staph_Ep1.ST25

gttgaagttg aagtattaac tgaaagcggg gctttcggac gtgcattagt accttctggt 120
 gcttctactg gtgaacatga agcagttgaa ttacgtgatg gagataaatc acgttattta 180
 ggtaaagggtg tgactaaagc ggtagaaaat gttaacgaaa tgatcgcacc agaaatcggt 240
 gaagggtgaat tttcagtttt agatcaagta tctattgata aaatgatgat tcaattagac 300
 ggtacacaca acaaaggtaa attaggtgca aatgccattt taggtgtttc tattgccgta 360
 gctcgtgcag ctgctgactt attaggtcaa ccattatata aatatttagg tggatttaat 420
 ggtaaacaat tgccagtacc tatgatgaat attgttaatg gtggttctca ctcatatgca 480
 ccaattgctt tccaagagtt catgatttta cctgtagggtg ctgagtcatt caaagaatca 540
 ttacgttggg gtgcagaaat cttccataac cttaaatcaa tcttaagtga acgtgggtta 600
 gaaactgcag taggtgatga aggtgggtttc gtccttagat ttgaaggcac tgaagacgct 660
 gtagaaacta ttattaaagc tatcgaaaaa gcaggataca aaccagggtga agatgtattc 720
 ttaggatttg actgtgcttc ttctgaattc tatgaaaatg gtgtttatga ttacactaaa 780
 ttcgaagggtg aacacgggtgc taaacgtagt gcagcagagc aagttgacta cttagaagaa 840
 ttaattggta aatatccaat catcactatt gaagatggta tggatgaaa cgattgggaa 900
 ggttggaac aattaactga tcgtatcggg gataaagttc aattagttgg tgatgattta 960
 ttcgtaacta acactgaaat tttatctaaa ggtatcgaac aagggtattg taactcaatc 1020
 ttaatcaaag taaaccaaat cggtagatta actgaaacat tcgatgctat tgaaatggct 1080
 caaaaagctg gatatactgc ggttgatatc caccgttctg gtgaaactga agatactaca 1140
 attgctgata tcgcagttgc tacaaatgca ggccaaatta aaacagggtc attatctaga 1200
 actgaccgta ttgctaaata caatcaatta ttacgtattg aagatgaatt atacgaaaca 1260
 gctaaatttg aaggaattaa atctttctac aatttagata aataa 1305

<210> 44
 <211> 1407
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus epidermidis

<400> 44
 atggtagttg gagatttccc aattgaaaca gatactattg taataggagc aggtccagggt 60
 ggatatgtcg cagccattcg cgcggctcaa ttaggacaaa aggtacaat cgttgagaaa 120
 ggtaatntag gtggtgtatg cttaaacgtt ggttgatac cttcaaaagc attactacat 180
 gcttctcatc gctttgttga agcgcaaaat tcagaaaact taggggtaat tgctgaaagc 240
 gtttcgttaa actatcaaaa agttcaagaa ttcaagactt ctgtagttaa taaattaact 300
 ggcgggtgtg aaggactttt aaaaggtaac aaagtagaga ttgttagagg tgaagcttat 360
 ttcgttgata acaatagttt acgtgtcatg gacgaaaaga gtgctcaaac ttacaatttc 420
 aaacatgcga ttatagctac aggttcaaga ccaattgaaa ttccaaattt tgaatttggc 480
 aaacgtgtta tcgattcaac aggagcttta aatctacaag aagtaccta caaactagtt 540

AM101548_Staph_Epi.ST25

. nn?n1

gtagttggtg gcggatatat cggttctgaa ttaggtactg cttttgcaa ctttggctct 600
 gaagttacta tccttgaagg tgcaaaagat attttaggcg gatttgaaaa gcaaatgaca 660
 caacctgtta aaaaagggtat gaaagaaaaa ggtatcgaaa tcgttactga agcaatggca 720
 aaatctgcag aagaaactga aaatggtgtc aaagtaactt atgaggcaaa aggtgaggaa 780
 caaactatcg aagctgatta tgtattagtt acagttggcc gtcgccctaa tactgatgaa 840
 ttaggattag aagaacttgg tctgaaattt gctgatcgtg gattactaga agtggacaaa 900
 caaagtcgta ctctattga aaatatcttt gcgattggag atattgtacc tggattacca 960
 ttagctcaca aagctagtta tgaaggtaaa gttgctgctg aagcgataga tggccaagcc 1020
 gcagaggtag actatattgg tatgccagca gtttgcttta cagaaccaga attagcacia 1080
 gttggttata ctgaagctca agcaaaagaa gaaggtttat caattaaagc ttctaaattc 1140
 ccttatgcag ctaatggacg agctttatca ttagatgata caaatgggtt tgttaagtta 1200
 attacactta aagaagatga tacgcttatt ggagcacaag ttgtaggtac tggcgcatct 1260
 gatattatct ctgaattagg tttagctatt gagtcaggtg tgaatgctga agatattcga 1320
 ttaactgtac atgcacaccc aactttaggt gaaatgacaa tggaaagctgc tgaaaaagca 1380
 attggttatc caattcatac tatgtaa 1407

<210> 45
 <211> 840
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus epidermidis

<400> 45
 atggacttag caactaaata ttttaataca atcaactggc gttatgtcga tcattcaagt 60
 ggttagagc ccatgcaatc ttttgcgtt gatgacactt tttccgaaag cgttggtaaa 120
 gatttatctt gtaatgtagt acgaacgtgg atacatcaac acaccgtgat tttgggcatt 180
 catgattcgc gtttaccatt ttttaagtgt ggtattcgtt ttcttacaga tgaacaagga 240
 tataatgcaa ttgttaggaa ttctggtggc ttgggtgtcg tattagatca aggaatttta 300
 aacatatctt tgatttttaa aggacaaacc gaaacgacta ttgatgaagc ctttacagtg 360
 atgtatttat tgattaataa aatgtttgag gatgaagatg ttagtatcga tactaaagaa 420
 attgagcaat cgtattgccc aggaaaattt gatttaagta ttaatgataa gaaatttgcc 480
 gggatttcgc agcgacgagt acgtggtggc atcgagtgac aaatatactt atgtattgaa 540
 ggttctggct cagaacgggc attaatgatg caacagtttt atcaacgtgc gcttaaaggg 600
 gagactacta aatttacta tccagacata gatccctcat gtatggcatc tttagaacc 660
 cttttaata gagaaattaa agtgcaagat gttatgtttt tattattata tgcactaaaa 720
 gatttagggg caaacttaa tatggatcct attacagaag acgagtgagc acgttacgaa 780
 gggatttatg ataagatgtt agaacgcaat gcgaaaatga atgaaaaatt agatttttag 840

11

. 00902

AM101548_Staph_Ep1.ST25

<210> 46
 <211> 933
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus epidermidis

<400> 46
 atggcacaaa aacctgtaga ttatgttaca caaattattg ggaatacacc tgtagtcaaa 60
 ttaagaaacg ttgttgatga tgatgcagct gatatttatg ttaagttaga atatcaaaat 120
 ccagggtggtt cggtaaaaga tcgtatcgct ttagcgatga ttgaaaaagc tgagcgtgaa 180
 gggaaaatta aacctggtga tacaatcggt gagcctacga gtggtaacac tgggtataggt 240
 ctagcatttg tatgtgctgc caaggggtac aaagcagttt ttacaatgcc tgaaacaatg 300
 agccaagagc gccgtaactt attaaaagct tatggtgctg aactagtatt aacaccagga 360
 tctgaagcta tgaaggtgc aataaaaaaa gctaaagaat taaaagaaga gcacggctat 420
 tttgaaccac aacaattcga aaatccagca aatcctgaaa ttcattgaact tacaactgga 480
 ccagaattag ttgaacaatt tgaaggtcga caaattgatg catttttagc tgggtgtagga 540
 actggtggtg cgttatctgg tgttggtaaa gtattgaaga aagaatatcc aaatgtggaa 600
 atagtagcta ttgaacctga agcttctcca gtattaagcg gtggtgaacc aggccctcat 660
 aaattacaag gattgggagc aggtttcgta cctgatactt taaatacaga agtttatgac 720
 agcatcatca aagtaggtaa tgatactgct atggatatgg cacgtcgtgt tgctagagaa 780
 gaaggtatat tagcaggtat ttcattctgg gctgcaatat atgctgctat tcaaaaagca 840
 aaagaattag gtaaaggtaa aacagttgta acagtattac caagtaatgg ggaacgttac 900
 ttatcaacac cattatattc atttgataat taa 933

<210> 47
 <211> 1428
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus epidermidis

<400> 47
 atgcattttg aaacagtaat cggacttgaa gttcatgttg agttaaaaac ggactcaaaa 60
 atgttctctc catcacccgc acatttttga gctgaaccaa attcaaatac aaatgttatc 120
 gacttagctt atccagggtg attaccagta gttaatagac gtgcagtaga ttgggcaatg 180
 agagcttcaa tggcattaaa tatggatatt gctacaaatt caaaatttga tcgtaaaaac 240
 tatttctatc cagataatcc aaaagcatat caaatttctc agtttgatca acctattgga 300
 gaaaatggct atattgatat tgaagttgat ggagaaacaa aacgtatcgg tattacacgt 360
 ctcatatgg aagaagatgc aggtaaatca acacataaag atggttattc tctagtagac 420
 ttaaaccgtc aaggtagcgc attaattgaa attgtatctg aacccgatat tcgttcacct 480
 aaagaagcat atgcttatct agaaaaacta cgttcaatca ttcaatatac aggtgtatct 540
 gattgtaaaa tggagagagg atccctacgt tgtgatgcta atatttcact tcgtccatat 600
 ggtcaaaagg aatttggtac aaaaactgaa ttgaaaaacc ttaactcatt taactacgtt 660

AM101548_Staph_Ep1.ST25
aaaaaagggtt tagaatatga agagaaacgt caagaagaag aattattaaa tgggtggagag 720
attggtcaag aaacacgtcg atttgatgaa tctactggta aaacaatttt aatgcgtgtg 780
aaagaagggtt cagatgatta tagatatctt cctgaaccag atattgtacc attatatgta 840
gatgaagatt ggaaagcacg tgtaagagaa acaattccag aattgccaga tgaacgtaaa 900
gctaaatacg taaatgatct tggactacca gaatatgatg cgcattgtatt aacattaact 960
aaagaaatgt ctgatttctt tgaaggcgca attgaccatg gtgcagatgt taaacttact 1020
tccaactggt taatgggagg tgttaacgag tatcttaata aaaatcaagt tgaattaaaa 1080
gatacgcaac taacacctga aaatttagct ggtatgatta aattaataga agacggaaca 1140
atgagtagta aaatcgctaa aaaagttttt ccagaactag cagaaaatgg tggagatgct 1200
aaacaaatta tggaagataa aggttttagta caattttctg atgaagcaac actacttaaa 1260
tttghtaacg atgcattaga taataatcca caatcaatag aagattataa aaatggtaaa 1320
ggtaaagcta tgggattctt agtgggcca aattatgaaag cttctaaagg tcaagctaac 1380
ccacaaaaag ttaatagcct attaaaacaa gaattagata accgttaa 1428

<210> 48
<211> 1095
<212> DNA
<213> Staphylococcus epidermidis

<400> 48
atgtttaaac gtgcaaatga aaatgaagag gcttggaaata atatgcttaa aaattatagt 60
gaagcctatc cgggaattagc tgaagaattt aaattagcaa tgagtggtaa gttaccaaat 120
aattacgctg atgccttacc agaatatgat ttaaatcaca gtgggtgcttc tagagctgat 180
tcaggagaaa taattcaaaa attaagcgag tttgtacctt cattctttgg tggatcagca 240
gacttagcag gttcaataaa atctaacgtt aaagaagcta aagattataa taaagatact 300
ccagaaggta aaaacgtatg gtttgggtgta cgtgaatttg caatgggagc agcaataaac 360
ggcatggcag cacatgggtg acttcatcca tatgcagcaa cattctttgt attcagtgat 420
tacctaaaac cagcttttacg attatcatca atcatgggac tcaattcaac gttcatcttt 480
actcatgatt caattgctgt aggtgaagat ggccctacac acgaacctat tgaacaatta 540
gcaggctctt gtgctattcc taacatgaat gttattcgtc cagctgatgg taatgaaca 600
cgtgtagctt ggggaagttg acttgaatca gaacaaacac caacatcatt agtggttaact 660
cgtcaaaatt taccaacttt ggatgttgat aaacaaacag ttgaaaatgg tgtgagaaaa 720
ggtgcatata ttgtttttga aacagaacaa caacttgaat atttattatt ggcatctgga 780
tcagaagtta atttagctgt agaagccgca aaagaattag agcaacaagg taaaggtgta 840
cgagttattt ctatgccaaa ctggtacgca tttgaacaac aatcttctga atataaagaa 900
tcaattttac cttctgatgt tactaaacgt atagctatcg aaatggcatc accacttggt 960
tggcataaat atgttgggaat tgaaggtaaa gtcattggta taaatagttt tggcgctagt 1020

112

000004

AM101548_Staph_Epi.ST25

gctcctggag atttagtagt tgaaaagtat ggattcacta aagaaaatat tttaaaacaa 1080
gtccgttcat tataaa 1095

<210> 49
<211> 1005
<212> DNA
<213> Staphylococcus epidermidis

<400> 49
gtggaatcag tgagagggtt aaaaatttta agtgtaattg gcttattggt tgttttaatt 60
gcaactgcag catgtggaaa taatagttca agtaactcaa gttaaagagtc atcaaaagat 120
ggagttgaaa tcaagcacga agaagggtact acgaaagtac cttaaacaccc taaacgtggt 180
gttggttcttg agtattcatt tgttgatgct ttagttgctt tagatgttaa acctgttggg 240
atagcggatg ataacaaaaa aaatcgtatt attaaacat taagagataa aattggaaaa 300
tacacttctg taggaacacg taagccacct aacttagaag aaatcagtaa acttaaacca 360
gatttaatta ttgctgataa taatagacac aaagggtatt ataaagactt aaataaaatt 420
gctcctacga ttgaactgaa aagtttctgat ggagattata atgaaaatat tgatgctttt 480
aaaacaattt caaaagcttt aggtaaagaa gaagaaggta aaaaacgctt agaagaacac 540
gataagaaaa ttgaagaata taaaaaagaa ataactatgg ataaaaatca aaagggtattg 600
cctgcagtag ctgctaaatc aggtttgctt gctcatcaa gcaactctta tgttggtcaa 660
ttcctaagtc aactagggtt taaagaagca ttaagtgtg atgttactaa aggtttaagt 720
aagtatctta aaggacctta cttacaaatg aacactgaaa ctttatctca agtgaatcct 780
gagcgtatgt tcataatgac aaacaaagca agttctaacg aaccttcact aaaagaacta 840
gaaaaagatc ctgtatggaa gaaattaaac gctgtgaaaa atcaacgtgt tgatatttta 900
gaccgtgact tatgggcaag atcacgtggt ttaatttctt cagaagaaat ggcaaaagaa 960
cttgttgaat tatctaagac agatagtaaa aaagataata agtaa 1005

<210> 50
<211> 1236
<212> DNA
<213> Staphylococcus epidermidis

<400> 50
atgagagata aatttgaaat aacttttatt aagaatagga gagatttaat aatggcaaaa 60
gaaaaatttg atcgctcaa agaacatgcc aatattggta ctatcgggtca cgttgaccat 120
ggtaaaacaa ctttaacagc tgctatcgca actgtattag ctaaaaatgg tgacactgtt 180
gcacaatcat acgatatgat tgacaacgct ccagaagaaa aagaacgtgg tattacaatc 240
aatactgcac atatcgaata ccaaactgac aaacgtcact atgctcacgt tgactgcca 300
ggacacgctg actatgttaa aaacatgatc actgggtgcag ctcaaatgga cggcgggtatc 360
ttagttgtat ctgctgctga cggccaatg ccacaaactc gtgaacacat cttattatca 420
cgtaacgttg gtgtaccagc attagttgta ttcttaacaa aagttgacat ggtagacgac 480

AM101548_Staph_Epi_ST25

. 00205

```

gaagaattat tagaattagt tgaaatggaa gttcgtgact tattaagcga atatgacttc 540
ccagggtgacg atgtacctgt aatcgctggt tctgcattaa aagcattaga aggcgatgct 600
gaatacgaac aaaaaatctt agacttaatg caagcagttg atgattacat tccaactcca 660
gaacgtgatt ctgacaaacc attcatgatg ccagttgagg acgtattctc aatcactggt 720
cgtggtagtg ttgctacagg ccgtgttgaa cgtgggtcaa tcaaagttgg tgaagaagtt 780
gaaatcatcg gtatgcacga aacttctaaa acaactgtta ctgggtgtaga aatgttccgt 840
aaattattag actacgctga agctgggtgac aacatcggtg ctttattacg tgggtgtgca 900
cgtgaagacg tacaacgtgg tcaagtatta gctgctcctg gttctattac accacacaca 960
aaattcaaag ctgaagtata cgtattatct aaagatgaag gtggacgtca cactccattc 1020
ttcactaact atcgcccaca attctatttc cgtactactg acgtaactgg tgttgtaaac 1080
ttaccagaag gtacagaaat ggttatgcct ggcgacaacg ttgaaatgac agttgaatta 1140
atcgctccaa tcgctatcga agacggaact cgtttctcaa ttcgtgaagg tggacgtact 1200
gttggatcag gcgttgtaac tgaaatcttt gaataa 1236

```

```

<210> 51
<211> 1287
<212> DNA
<213> Staphylococcus epidermidis

```

```

<400> 51
atgatgagtt ttgaaaaatc tattaagcga atggagcaag ctgagaaatt aatgcctggc 60
ggtgttaaca gtcccgtaag agcatitaaa tcagtagaca caccagctat ttttatggat 120
catggtgaag gatctaaat atatgatatt gatggaaatg aatacattga ttatgtgcta 180
agttggggcc cattaattct gggacataaa aatcaacaag ttatatccaa attacatgaa 240
gcagtagata aagggtacaag cttcggcgct tcaacacttc aagaaaataa acttgctgaa 300
cttgtagattg accgtgtacc ttcaattgaa aaagtaagaa tggtttcctc aggaactgaa 360
gctactttag acacacttcg tttagctagg ggttatacag gacgtaataa aattataaaa 420
tttgaagggg gttatcatgg acacagtgat tctttattga ttaaagcagg atcaggtggt 480
gcaacactag gtttacctga ttcaccaggc gtccctgaag gtattgctaa aaacactatc 540
acggtgccat ataatgattt agattcactt aaattagcgt tcgaaaaata tggcgatgat 600
attgctggtg ttattgttga accggttgct ggaaatatgg gtgtagtgcc tccagtgaat 660
ggattttctac aagggttaag agatattact aatgaatatg gagcattact tatatttgat 720
gaagtgatga ctggtttccg tgtagggtat aattgtgcgc aaggatactt tgggtgaaca 780
cctgatttaa cttgcttagg aaaagtgata ggtggagggt taccctgttg agcttttggg 840
ggtaaaaaag aaattatgga ttacattgct cctgttggga ctatttatca agctggcaca 900
ctttcaggta atcctttagc aatgactagt ggttatgaaa cattgagtca acttactcct 960
gaatcttatg agtatittaa ttctctagga gatatacttg aaaaaggatt aaaagaggta 1020

```

AM101548_Staph_Epi.ST25

tttgctaagt ataatgttcc aatcacagta aatcgcgctg gttcaatgat tggttacttc 1080 . n n n n
 ttaaatgagg ggcctgtaac aaattttgag gaagcaaata aaagtgattt aaaattattt 1140
 agtaatatgt atagagaaat ggctaaggaa ggtgtttaca taccaccttc acaatttgaa 1200
 ggaacatttt tatcaactgc acatactaaa gatgatattg agaaaactat ccaagcattt 1260
 gataatgcat taagtcgtat tgtgtga 1287

<210> 52
 <211> 861
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus epidermidis

<400> 52
 atgcctttag ttccaatgaa agaaatgtta atcgatgcga aagaaaacgg ttatgcgggt 60
 ggtcaataca atcttaataa cctcgaattt acacaagcta ttttagaagc gtctcaagaa 120
 gagaatgcdc cagttatttt aggtgtttct gaaggggcag ctcttatat gagtgggttt 180
 tatacagttg tgaaatggt agaaggttta atgcatgact taaacatcac aatcccagta 240
 gcaattcatt tagaccacgg ttcaagcttt gaaaaatgta aagaagcaat tgatgctgga 300
 ttcacatctg taatgattga tgcattctcat agtccttttg aagaaaatgt tgaaatcact 360
 tctaaagtag ttgagtatgc tcatgataga ggcgtttctg tagaagctga attaggtaca 420
 gttggtggac aagaagacga cgtagtgtct gatggcgta tctatgcaga ccctaaagaa 480
 tgtcaagaat tagtagaaaa aactggaatt gatactttag ctccagcatt aggttctgta 540
 catggaccat ataaaggtga acctaaatta ggatttaaag agatggaaga aattggtgct 600
 tcaactggat tacctttagt attacacggt ggtacaggta ttccaactaa agatattcaa 660
 aaagctattc cttatggtac tgctaaaatt aacgtgaata ctgaaaatca aattgctgct 720
 gctaaagcag ttcgtgaagt attaaacaac gacaaagatg tgtatgatcc acgtaaatat 780
 ttaggaccag cactggaagc aattaaagag acagttaaag gtaaaattag agaattcggt 840
 acttctaadc gcgctaaata a 861

<210> 53
 <211> 1407
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus epidermidis

<400> 53
 atgacacaac aaattggagt agtgggttta gcagtaatgg ggaaaaacct agcttggaat 60
 attgaatcac gtggttatag tgtttctggt tataaccgat caagacaaaa aactgatgaa 120
 atggttaaag aatgccttgg aagagaaatt tacccaacat actcattaga agaatttgta 180
 gaatcttttag agaaacctcg taagatttta ttaatggtaa aagctggacc tgcaacagat 240
 gccactatag atggtttatt acctttatta gacgatgatg atattttaat tgatggtggt 300
 aatactaatt accaagatac gattcgtcga aataaagctt tagctgaaag tagtattaac 360

nn2n7

AMD101548_Staph_Ep1.ST25
tttattggta tgggagtttc tgggtggagaa atcggcgcac tcacgggccc ttctttaatg 420
ccagggtggc aaaaagatgc ttataacaaa gtcagcgata tcttggacgc aattgctgct 480
aaggcacaag atggtgcttc atgtgtaact tacattggcc ctaatggtgc aggacattat 540
gttaagatgg tacacaatgg tatcgaatat gcagatatgc aattaattgc tgaaagttaa 600
gcaatgatga aagatttatt aggcattgtc cataaagaaa ttctcacaac ttttaagaa 660
tggaatgctg gagaacttga aagttattta atagaaatta caggatgatat tttcaataaa 720
ttagatgatg acaatgaagc acttgtagaa aaaatattag atactgcagg tcaaaaaggc 780
acaggtaaata ggacttcaat taacgcacta gaattagggtg ttctttaaac aatcattaca 840
gaatctgtat ttgcgagatt catctcatca attaaagaag aacgtgttac tgcttctaaa 900
tctttaaaag gacctaaagc acattttgaa ggcgataaaa aaacattctt agaaaaata 960
cgtaaggcac tttatatgag taaaatatgc tcatatgcac aagggttcgc tcaaatgaga 1020
aaagccagtg aagataatga gtggaatttg aaattaggcg aattagcaat gatttggcgt 1080
gaaggttgta ttattcgtgc acaattccta caaaaaatta aagatgccta cgataataat 1140
gaaaacttac aaaacttatt attagaccct tacttcaaaa acattgttat ggaatatcaa 1200
gatgcactac gtgaagtagt agctactagc gtgtacaatg gcgtgccaac acctggtttt 1260
tcagcaagta taaattatta tgatagttat cgctcagagg atttacctgc aaacttaatt 1320
caagcacaac gtgattactt tggcgacat acttatgaac gtaaagaccg tgaaggtatt 1380
ttccatacac aatgggtaga agaataa 1407

<210> 54
<211> 789
<212> DNA
<213> Staphylococcus epidermidis

<400> 54
atgaaaagac ttttactttg cattgttgca cttgtttttg ttttagcagc ctgtggcaac 60
aattcatcta acaataaaga taatcaatca agcagtaaag acaaggatac gttaagagtt 120
ggtagcgaag gtacatatgc gccctttact taccataata aaaaagatca attaacaggt 180
tatgatattg atgtgattaa agcagttgca aaagaagaaa atcttaaaact taagttaa 240
gaaacgtcat ggpattcaat gtttgcagga ttagatgctg gtcgttttga tgttattgca 300
aatcaagtgg gtgtgaataa agatagagag aaaaaatata aattctctga accttacaca 360
tattcaagtg ctgtacttgt tgttcgtgaa aatgaaaaag atattacatc attcaatgat 420
gtaaaaggta aaaagttagc acaaacgttt acgtctaatt atggtcaatt ggctaaagat 480
aagggtgcgg acattactaa ggtagatgga tttaatcaat caatggactt actattatct 540
aaacgtgtag atggtacatt taacgacagt ttatcttact tagattacag aaaacaaaag 600
cctaattgta aaattaaagc aatcaaagga catgcagaac aaaataaatc agcatttgca 660
ttctctaaga aggttgatga aaaaacgatt gagaaattta ataaaggcct agaaaaaatt 720

114

AM101548_Staph_Ep1.ST25
agagataatg gtgaattagc taaaattggg aagaatggg ttggccaaga tgtttctaaa 780 ... ~~nnnn~~
cctgaataa 789

<210> 55
<211> 933
<212> DNA
<213> Staphylococcus epidermidis

<400> 55
gtgtatatga ctaaatatgt gttgaaacga ttgtgttata tgtttgtgtc gttattttatt 60
gttataacaa ttacattttt cttaatgaaa ttaatgccag gatctccgtt taatgacaca 120
aaacttaatg cgcaacaaaa agaaatatta aatgaaaagt acggtttgaa tgatccagta 180
gcattacaat atgttaatta ttgaaaaat gtagtaacag gtgattttgg caactcattt 240
caatatcata atatgccagt gtgggattta gttaaaccac gattgatacc ttcaatggag 300
atgggaataa cagctatggg tattgggtgtt gttttagggt tagtattagg tgttgctgct 360
gctactaaac aaaatacatg ggtagactat acaacaacaa ttatctctgt tatcgagta 420
tcagtgccgt cttttgtctt agcagtttta ttgcagtatg tttttgcagt taagttagaa 480
tggtttccag ttgcaggatg ggaagggttt tctacagcta ttttaccttc tctagcacta 540
tcagctacag ttttagcaac tgttgcaaga tatattagag ctgaaatgat tgaagtactc 600
agttcagatt acatactttt agctcgagct aaaggaaatt ctactttaaa agtgctcttt 660
ggacatgcat tacgaaatgc attaatctct attattacaa tcattgtacc tatgttagca 720
ggtatattaa caggaacatt aacaattgaa aatatctttg gtgttccagg attaggtgat 780
caatttgttc gttctataac tacaaatgat ttttcagtca tcatggctac aacgatatta 840
ttcagtaatt tattttattgt ttcatctttt attgtagaca ttttatatgg tgttatcgat 900
ccaagaattc gtgtacaagg gggcaagaaa taa 933

<210> 56
<211> 1545
<212> DNA
<213> Staphylococcus epidermidis

<400> 56
gtgaatgaag agcaaagaaa ggctggaacg ataaatattc tagcagaacg tgatcgtaaa 60
gctgagaaaag attatagtaa atactttgaa caagtgtatc agccacctag cttaaaagaa 120
gctaaaaaaa gaggaaaaca agaagttcaa tataacagag attttcatat agatgaaaaa 180
tacaagggtg tgggtaaagg tcgcactttt ttaattaaaa catatggatg tcaaatgaat 240
gcacatgaca ctgaagttat ggcaggaata ttaaatgcat taggatatag tgctacttcg 300
gatattaatg aagcggatgt gattttaatt aatacatgcg ccattagaga aaatgctgaa 360
aataaagtct ttagtgaant aggaatttta aaacatttaa aaaaagaacg cccagattgt 420
ttaattgggg tgtgtggttg catgtctcaa gaagaatcag tcgtaataaa aatattaaaa 480
tcttatcaaa atgtagatat ggtttttggg acacacaaca tcatcattt acctgagatt 540

AM101548_Staph_Epf.ST25

ttagaagagg catatttatc taaagcgatg gtagttgaag tatggtctaa agaggggagac 600
atcatcgaaa atttacctaa agtgcgtgac ggtcacatta aagcttggtt taatattatg 660
tatggttgcg ataagttttg tacttattgt attgttccat ttactagagg aaaagaacgt 720
agtcgtcgtc cagaggacat cattgatgag gttagagaat tagcaagaga aggttatcaa 780
gaaattacct tattaggtca aaatgtaa tcatatggtt aagatatcga aggtctggat 840
tatgaattag gtgacttatt ggaagatatt tctaaaattg atataacctg tggtcgtttt 900
acaacaagtc atccttggga ctttacagat cgaatgattg aagttatagc taaaggtggg 960
aacatagtag cgcataatcca ttaccggta caatcaggtt ataaccaagt attaaagata 1020
atggggcgta aatatacaag agagagttat cttgatttag tttcaagaat aaaggaagct 1080
atccctaacy tagctctaac tactgatatc atagtaggtt atcctaataa aactgtaga 1140
caatttgaag aaacattatc atttatatgat gacgttcaat ttgagcatgc atacacatat 1200
ttatatccac aaagagatgg aacaccagca gctaaaatga aggataacgt accttagaa 1260
gtgaaaaaag aacgtttgca aaggcttaat aagaagggtt gaatatattc tcaacaagca 1320
atgagtcagt atgaaggtaa gattgttacg gtattatgtg aagggttctag taaaaaagat 1380
gagaatgttc tagcaggcta tactgataaa aataaacttg tgaattttaa aggaccaaga 1440
gagagcattg gtaaaactcg tgatgtcaaa attgacgagg caaaacaata ttctttaaat 1500
ggaacattta tacaagaaca tcaacgttca atggtgacac aataa 1545

<210> 57
<211> 1185
<212> DNA
<213> Staphylococcus epidermidis

<400> 57
atgtcacgca tagtattagc tgaagcatat cgaacaccta taggcgtggt tggtggtgta 60
tttaaggata tacctgccta tgaactaggt gcaacagtta ttcgtcaaat tttagaacat 120
agtcaaatag atcctaataa aatcaatgaa gttattctag gaaacgtatt acaggcaggt 180
caaggacaaa atcctgctcg tattgctgag attcatggtg gtgtgccaga agcggtagct 240
tcttttactg taaataaagt ttgcggttct ggattaaaag cgattcaact tgcctatcaa 300
tctattgtag cgggagataa tgagattggt atcgtctggg gcatggaaag tatgtctcaa 360
tctccaatgc ttcttaaaaa tagtcgtttc ggttttaaaa tgggaaatca aactttagaa 420
gatagtatga tagctgatgg ttaactgat aagtttaatg attaccatat gggatatcaca 480
gccgaaaatc tagttgaaca gtatcagatt agtcgtaaag aacaagatca atttgcatc 540
gattctcaac aaaaagcatc acgtgcacaa caagctggtg tatttgatgc tgaatttga 600
cctgtagagg taccacaacy taaaggcgac ccctaatta tttctcaaga tgaaggcatt 660
agacctcaaa cgacaattga taagttagca caactccgtc cagcatttaa aaaagatgga 720
tcagtaactg ctggtaatgc atccggtatc aatgacggtg ctgctgctat gctcgttatg 780

AM101548_Staph_Ep1.ST25

. b. 00918

acggaggaca aagcgaaagc attgggctta caacctatag ctgtattaga tagttttggt 840
 gcgagtgggtg tggcgcccttc aattatgggt attgggtccag ttgaagcgat acataaagct 900
 ttaaaacgtt ctaataaagt gataaatgat gttgatattt ttgaattaaa cgaagctttt 960
 gcagcgcaat caattgctgt aaaccgtgag ttgcaattac cgcaagataa agtcaatggt 1020
 aatgggtgggtg cgattgcact aggacatccg ataggggctt cgggtgcgcg tacttttagtt 1080
 tcattattac atcaattaag tgatgctaag ccaacagggtg tggcatcttt atgtatcgggt 1140
 ggcgggtcaag gtatcgctac ggttgatatct aaatatgaag tttaa 1185

<210> 58
 <211> 879
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus epidermidis

<400> 58
 atggcaattt cagcaaaact tgtaaagaa ttacgtgaaa aaactggcgc aggaatgatg 60
 gattgtaaaa aagcgctaac tgaaactgat ggtgacatcg ataaagcgat tgactactta 120
 cgtgaaaaag gtattgcaaa agcagctaaa aaagctgacc gtatcgagc agaaggactt 180
 gtacacgttg aagtaaaaga taatgaagct gcaatcgttg agattaattc agaaacagac 240
 ttcgtagcac gtaacgaagg tttccaagaa ttagttaaag aaattgctaa ccatatttta 300
 gatagcaagg tagaaacagt agacgctttg atggaatcta aattatctag cggtaaaact 360
 gttgatgaaa gaatgaaaga agctatctca acaattgggtg aaaaattaag tatccgtcgt 420
 ttctctatca gaacaaaaac tgataatgat gcatttggtg catatttaca catgggtgga 480
 cgtattgggtg tgtaactgt agtgaaggt actactgatg aagaagctgc taaagacgta 540
 gcaatgcaca ttgcggcaat caaccctaag tatgtttctt ctgaacaagt aagcgaagaa 600
 gaaatcaatc atgaagaga agtattaaaa caacaagcat taaacgaagg taaaccagag 660
 aaaatcgttg aaaaaatggt tgaaggtcgt ttacgtaaat atttacaaga aatttggtgct 720
 gtagatcaaa acttcgttaa aaatccagac gaaactgttg aagctttctt aaaagctaaa 780
 ggtggtaaac ttactgattt cgttcgttat gaagttggag aaggtatgga aaaacgtgaa 840
 gaaaactttg ctgaagaagt taaaggacaa atgaaataa 879

<210> 59
 <211> 933
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus epidermidis

<400> 59
 atgactgaag tagattttga tgtagcaata atcgggtgcag gtcctgccgg tatgacagca 60
 gcagtatatg catctcgtgc caatttaaaa actgtcatga ttgaacgcgg tatgccaggc 120
 ggtcaaatgg caaacactga agaagtagag aattttccag gatttgagat gatcacaggt 180
 cctgacttat ctactaaaat gtttgaacat gtaaaaaaat ttggtgcgga ataccaatat 240

AM101548_Staph_Epl.ST25

ggcgatatta aatctgttga agataaaggc gactataaag ttatcaattt aggggaataaa 300
 gagataacag cacatgcagt tattatctca actggagcag agtataaaaa gattggcgtt 360
 cctggtgaac aagaattagg aggacgtgga gtaagttatt gtgcggtttg tgatggagca 420
 ttctttaaaa ataaacgtct ttctgtaatt ggcggcggag attcagcggg agaagaagg 480
 actttcttaa ctaaatttgc agataaagta acgattgttc accgtagaga tgaattacgt 540
 gcacaaaaca tcttgcaaga acgtgccttc aaaaatgata aagttgactt tatttggagt 600
 catacactta aaacaattaa tgaaaaagat ggtaaagttg gttcagttac acttgaatca 660
 actaaagatg gtgctgaaca gacttatgat gccgacggtg tattcattta tattggaatg 720
 aaaccactca cagcaccatt taaaaatctt ggtattacaa atgacgcggg atacattgtc 780
 acacaagatg acatgagtac taaagtacga ggtatttttg ctgcagggtga cgttcgtgat 840
 aaagggttac gtcaaattgt tactgctaca ggagacggtg gtattgcggc tcaaagtga 900
 gctgattata ttacagaatt aaaagataat taa 933

<210> 60
 <211> 1398
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus epidermidis

<400> 60
 atgactcaaa agtatagata tcctactttt ttagaatcta tttctactat tttagttatg 60
 gttgtcgttg tagtaattgg ttttgttttc tttaatgtcc cgatacaaat attattatta 120
 atttcttcag cttatgcagc attgattgca catagagtgg gattaaaatg gaaggattta 180
 gaagagggga ttactcatcg attgagcacg gcgatgccag ctatctttat tatttttagct 240
 gttggaatca ttgtaggaag ttggatgtat tctggaacag ttccagcgtt aatttactat 300
 ggacttaaat ttttaaaccc aagttattta ttagtatctg catttataat cagtgcattg 360
 acttcaatcg ctacaggaac ggcttgggga tcggcatcta cagcaggcat tgcaactata 420
 tcaattgcta atcaattagg tgtgccagca ggtatggctg ctggtgccat tattgcaggg 480
 gcggtttttg gtgataaaat gtctccatta tctgatacta caaatttggc agctcttgta 540
 actaaagtta atatttttgc tcacattaaa tcgatgatgt ggacaacaat ccctgcttct 600
 ataataggat tggctatatg gtttattgtt ggattacaat ataagggaga cgcaaatata 660
 caacaaattc aaaatctatt aaaagaatta acaacaattt ataacttgaa tttttgggta 720
 tggatcccac ttattatcat agttttatgt ttaatattha gaatctctac agtaccgtca 780
 atgcttatct ctagtatcag tgcttttagt attggaacat tcgatcatca atttaatatg 840
 aaagatpggt ttaaagcttc ttttgatgga tttaatcata caatgctaca ccagtctcat 900
 atttcagata atgctaagac gttgattgag cagggtggta tgatgagtat gactcaaadc 960
 attgtaacta tattttgtgg ttatgctttt gctggtattg ttgaaaaggc aggttggtta 1020
 gacgtaattt tagagacaat agctaaaggc gtaaagtcag ttggaacact aatattaata 1080

116

nn 2

AM101548_Staph_Epi.ST25

actgtagttt gtagtattat gctagtattt gcagctggag ttgcttcaat agttattatt 1140
 atggtagggc tacttatgaa agatatgttc gaaaagatga atgtctcaaa gtcagtgtta 1200
 tctcgtacac ttgaagattc aagtacaatg gtattgccac tcattccatg gggcacatct 1260
 ggtatatatt atgcacacca acttaatgtt tcagttgatc agttctttat atgggcaatc 1320
 ccatgttact tatgtgcatt cattgcaata atttatggct ttacaggtat aggaattaa 1380
 aaaataagta gaaaataa 1398

<210> 61
 <211> 708
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus epidermidis

<400> 61
 atgaaaaaaa cagttatcgc ttctacatta gcagtatctt taggaattgc aggttacggt 60
 ttatcaggac atgaagcaca cgcttcagaa actacaaacg ttgataaagc acacttagta 120
 gatttagcac aacataatcc tgaagaatta aatgctaaac cagttcaagc tgggtgcttac 180
 gatattcatt tcgtagacaa tggatacaca tacaacttca cttcaaatgg ttctgaatgg 240
 tcatggagct acgctgtagc tggttcagat gctgattaca cagaatcatc atcaaaccac 300
 gaagtaagtg caaatcacac atctagtaac acaaatgtac aagctgtttc agctccaact 360
 tcttcagaaa gtcgtagcta cagcacatca actacttcat actcagcacc aagccataac 420
 tacagctctc acagtagttc agtaagatta tcaaatggta atactgctgg ttctgtaggt 480
 tcatatgctg ctgctcaaat ggctgcacgt actggtgtat ctgcttcaac atgggaacac 540
 atcattgcta gagaatcaaa tggtaatta catgcacgta atgcttcagg tgctgctgga 600
 ttattccaaa ctatgccagg ttggggttca actggttcag taaatgatca aatcaatgcc 660
 gcttataaag catataaagc acaaggttta tctgcttggg gtatgtaa 708

<210> 62
 <211> 891
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus epidermidis

<400> 62
 atgaataaag aacaattaga aaaaatgact catpgtaaag gattcattgc tgcattagac 60
 caaagtgggtg gtagtacacc taaagcactt aaagaatatg gtgtgaatga agaccaatac 120
 agtaatgaag acgaaatgtt ccaacttgtt cacgatatgc gtacacgtgt tctaacttca 180
 ccttcatttt cacctgataa aatttttaggt gcgattttat tcgaacaaac tatggatcgc 240
 gaagttgaag gtaaatacac tggagactat ttagcggaca aaggcgttgt tcctttctta 300
 aaagtcgaca aaggtcttgc tgaagagaaa aatggcgtac aattaatgaa acctattgat 360
 gatttagatg aaactttaga tcgtgcaaat gaacgtcata tcttcggtac taaaatgcgt 420
 tctaacatcc ttgaacttaa tgaacaagga atcaaagatg ttgttgaaca acaatttgaa 480
 ttcgctaaaa aaatcatcgc taaaggttta gtacctatta tcgaaccaga agttaatatt 540

AM101548_Staph_Epi.ST25

aatgctaag ataatctga aattgagaa gttttaaaag ctgaaatcaa aaaaggttta 600
 gattcattaa acgatgatca attagttatg ttaaaattaa ctattcctac tgaagctaac 660
 ttatataaag atttagctga ccacccta atgtgtacgt tagtagtatt atcagggtgt 720
 tacagccgag atgaagctaa caaattgtta aaagataacg atgaattaat tgcaagcttc 780
 tcacgtgcat tagcaagtga cttacgtgct agccaatcac aagaagaatt cgataaagca 840
 ttaggcgatg ctgtagattc aatctatgat gcgtcagtaa ataaaaacta a 891

<210> 63
 <211> 792
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus epidermidis

<400> 63
 ttgaagaga gatttattaa gaaaactcat tatttagact atcaatttga tgagcctact 60
 gatattaagt taggtttcac tactcgagaa aatgggttaa gtccttatcc taatcatagt 120
 tttaatatgg cgagatatat cagtgcagct gcacatcata ttacacatca tcaagatatc 180
 ttagcgaatc ttattggtta tccaagagat gaatgggttt ttctataca aacacatgat 240
 agtcgtatcg ttgaagttac aagtgaacat aaaggaacaa atattgatga actaactgat 300
 gatttacatg gcatagatgg aatgtatact ttgattctc acattcttct tactatgtgt 360
 tatgcggatt gcgtacctgt atatttttat agtgaaccac atggatatat aggattagca 420
 catgcagggtt ggcgaggaac atatggtcaa atagtaaaag acatgctaaa aaaagtggat 480
 ttgattatg aagacttaaa gattgtaatt ggtccagcaa cttcaaattc ttatgaaatc 540
 aatgatgata taaaaataa gtttgaggaa ttaaccattg attcaacttt atatattgag 600
 accagaggta aaaatcaaca tggattatgt ttgaaaaacg ctaacgcact tcttctagaa 660
 gaagctggag ttccatcaaa aaacatatac gttacggaat atgcaacttc agaaaactta 720
 gatttattct ttcatatcgt tgttgaaaaa ggacagacgg gacgtatgtt agcatttatt 780
 ggacpgaat aa 792

<210> 64
 <211> 30612
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus epidermidis

<400> 64
 atgaagagca aaccgaaatt aaacggctcg aacatctgct cttttttatt gagcaaatgt 60
 atgagttatt cattgtcaaa attatcaaca ttaaaaacgt ataattttca aatcacatca 120
 aacaacaaag aaaaaacatc aagaatagga gtggcaatag ctttgaataa tcgtgataaa 180
 ttacaaaaat ttagtattcg aaaatacgca attggaacat tttctactgt gattgcaaca 240
 cttgtgttca tgggtatcaa tacaaccat gcaagtgccg acgagttgaa tcaaaatcaa 300
 aagttaatta aacaattaaa tcaaacagat gatgatgatt cgaatacgca tagtcaagaa 360

177

.. 00224

AM101548_Staph_Epi.ST25

atcgaaaata acaaacaaaa ttctagtggg cagactgaat cattacgttc atcaactagt	420
caaaatcaag caaatgcacg actgtcggat caattcaaag acactaatga aacatcgcaa	480
caattaccta caaatgtttc ggatgatagt atcaatcaat cgcatagtga agcaaatatg	540
aataacgaac cattgaaagt tgataatagt actatgcaag cacatagtaa aatagtaagc	600
gatagcgatg ggaatgcttc tgaaaataaa catcataaac taacagaaaa tgtacttgca	660
gaaagccgag caagtaaaaa tgacaaagag aaagagaatc tacaagagaa agataaatcg	720
cagcaagtac atccaccatt agataaaaaat gcattacaag ctttttttga cgcatacat	780
cacaattaca gaatgattga tagagatcgt gcggatgcaa cagaatatca aaaagtcaaa	840
tctacttttg actacgtcaa tgacttacta ggtaataatc aaaatattcc ttcagaacag	900
cttgtttcgg catatcaaca attagagaaa gcattagaac ttgcacgtac gttatcacia	960
cgatctacta cagaaaaacg tggtagaaga agtacgagaa gtgttggtga gaatcggtca	1020
tcaagaagcg attacttaga tgctagaact gaatattatg tttcaaaaga cgatgatgat	1080
tctggtttcc ctcttggtac tttcttccat gcttcaata gaagatggcc ttataattta	1140
ccaagatcta ggaacatctt acgtgcttct gatgtacaag gtaatgctta tatcactaca	1200
aaacgactta aagatggata tcaatgggat attttattta atagtaatca taaagggcat	1260
gaatatatgt actattggtt tggacttcca agtgatcaaa caccaactgg tccagtaact	1320
ttcactatta tcaaccgtga tggttcaagt acatctactg gtggcggttg atttggatca	1380
ggtgcaccac tacctcaatt ttggagatca gcagggtgcta ttaattctag cgtagcgaat	1440
gatttttaac atggctccgc tacaaattat gcattttatg atgggtgtaa taatttttct	1500
gactttgcta gagggggaga attatacttc gacagagaag gcgctacaca aactaataaa	1560
tattatggcg atgaaaactt cgcattgcta aatagtgaga aaccagatca aataagagga	1620
ttagatacaa tatatagttt taaaggtagt ggtgatgtaa gttatcgtat ttcatttaaa	1680
actcaaggag ctccaactgc aagattgtat tatgctgctg gcgcgcgttc tggatgaata	1740
agacaagcaa cgaactataa ccaactctat gtcgaacctt ataagaatta tcgaaatcga	1800
gtacagtcaa atgtccaagt taaaaatcgt acacttcatt taaaaagaac aatcagacaa	1860
ttcgatccta cattacagag aactactgat gttcctatgt tggatagtga cggttccgga	1920
agtattgatt cggatatacga cccattaagt tatgtaaaga atgtgactgg tacagtccta	1980
ggtattttatc catcttatct tccgtataat caggaaagat ggcagggagc taatgcaatg	2040
aatgcctatc aaattgaaga acttttttca caagaaaatc ttcaaatgc agcacgttca	2100
ggtcgtccaa ttcaatttct ttaggtttt gatgttgaag atagccatca taaccctgaa	2160
actcttttac cagtaaattt atatgtaaaa cctgagttaa aacatacaat tgagttatat	2220
cacgataatg aaaaacaaaa tagaaaggaa ttttcagtat cgaaacgagc gggccatggg	2280
gttttccaaa taatgagtgg aacgcttcat aacactgtag gatcaggaat attaccttat	2340
caacaagaga ttcgtatcaa acttactagt aatgaaccaa ttaaagatag tgaatggtct	2400

AM101548_Staph_Epi.ST25

.a 00215

attacaggat atcctaacac gcttacatta caaaacgctg tgggtagaac aaataatgct 2460
 actgaaaaaa acttagctct tgttggcat attgatccag gaaattattt catcactgtt 2520
 aagtttgggtg ataaagtaga acaatttgaa attagatcaa aaccaactcc accaagaatc 2580
 attacaactg ctaatgaatt acgtggaaat cctaaccaca agcctgaaat aagagtaaca 2640
 gatataccaa atgatactac tgctaaaatc aaacttgtga tgggcggaac cgatgggtgat 2700
 catgatccag aaataaatcc atatactgtc cctgaaaact acacagtagt tgcagaagca 2760
 taccatgata atgatccaag taaaaatggg gtcttaacat tccgttcac agactacctt 2820
 aaagatctac cattaagcgg tgaattaaag gcaattgttt attacaatca atatgtacaa 2880
 tcaaacttta gtaatagcgt tccgttagt agcgatacaa caccacctac aattaatgaa 2940
 ccagcaggac tagttcataa gtattacagg ggagatcatg tagaaattac tcttcagtc 3000
 actgataata ctggcgggtc aggtttaaga gatgtaaacg tcaatttacc tcaagggttg 3060
 acaaaaacct ttacaatcaa tcctaataat aatactgagg gtacgcttaa gttaattgg 3120
 aatataccta gtaatgaagc atataatacg acatattcatt tcaatattac tgcaaccgat 3180
 aattctggaa atacaacaa tccagctaaa acctttattt taaatgttgg taagtggct 3240
 gatgatttaa atccagtcgg attatctaga gatcaactac aattagtac agacccttct 3300
 tcattatcta attccgaacg agaagaggta aaaagaaaaa taagtgaagc aaatgcta 3360
 ataagatcat atttattaca aaataaccca atactcgtg gagtaaacgg cgatgttaca 3420
 ttttattata gagatgggtc tgtagatgtt attgatgctg aaaatgtaac cacatatgag 3480
 cccgaaagaa aatccatttt cagtgaaaat ggttaatacaa ataaaaaga agcagtaatc 3540
 actattgcta gaggacaaaa ctataccatt ggtccaaact taagaaaata tttctcatta 3600
 agtaatgggt cggatttacc taatagagat ttcacctta tatcagctat tggatcttta 3660
 ccttcacga gtgaaattag tgcactcaat gttggaaatt ataactatag agttaatgct 3720
 aaaaatgctt atcataagac tcaacaagaa ctttaattta aacttaaaat agtagagggt 3780
 aatgcaccta ctggttaata tctgttatat agagttagta cttataattt aactaatgat 3840
 gaaatcaata aaatcaacaa agcattttaa gcagctaatt ctggacttaa tttaaacgat 3900
 aacgatatca ctgtttcgaa taactttgac catagaaatg ttagtagtgt gacagtaact 3960
 atacgtaagg gcgatttgat aaaagagttt tcatcaaatc tcaataatat gaatttctta 4020
 cgttgggtta atataagga tgattatacc atttcgtgga cttctagtaa gattcaagg 4080
 agaaatacag atggtggatt agaattgtca ccagatcata aatcacttat ttataaatat 4140
 gatgcaacat taggtagaca aataaatact aatgacgtgt taactttact tcaagcaaca 4200
 gctaaaaact caaatttacg ttcaaatatc aatagtaatg aaaaacagtt agcagaacga 4260
 gggctcaatg ggtattctaa atctataatt agagatgatg gcgagaaatc ttatttactt 4320
 aactcaaatc ctattcaagt attagactta gtagaaccag ataatgggtta cgggtggacgt 4380

AM101548_Staph_Ep1.ST25

caagtcagtc attctaacgt tatatataat gaaaaaaatt cttctatcgt aaatgggtcaa 4440
 gttccagaag ctaatggggc atccgctttt aatattgata aagttgttaa agctaatagcg 4500
 gcaaataatg gtattatggg tggtatctat aaggcacaat tatacttagc accatacagt 4560
 ccaaaagggtt acattgaaaa attaggccaa aatttaagca ataccaataa cgtgattaat 4620
 gtttattttg tgccttctga taaagtaa atctagtataa ctgtaggtaa ttacgacct 4680
 catacgggtat attctgggtga aacatttaaa aatactatca atgtaaatga taattatgga 4740
 ttaaatacag tagcttctac aagtgatagt gcaattacta tgaccagaaa caacaacgag 4800
 ttagtaggtc aggcctctaa tggtactaat agcacaata aaattgtaaa agttaaagcc 4860
 acagataaaa gtggaaatga aagtattgtt tctttcacag taaatataaa accattaaac 4920
 gagaaatata gaataacaac ttcatacagt aatcaaacac cagtgagaat tagtaatatt 4980
 caaaacaatg ctaacctttc aattgaagat caaaatagag taaaatcttc actcagcatg 5040
 actaaaattt taggtacaag aaattatgtc aatgagtcaa ataatacgt tcgtagtcaa 5100
 gttgtaagta aagtaaatag aagtgggaac aatgctacag ttaatgttac aactacattt 5160
 tctgatggta caactaatac aataaccgtt ccagttaaac atgtgttatt agaagttgta 5220
 cctactacta gaacaacagt aagaggacaa caatttccaa ccggcaaagg aacttcccc 5280
 aatgatttct ttagtttaag aacgggaggt ccagttgatg cgagaatagt ttgggttaat 5340
 aatcagggac ccgatataaa tagtaatcaa attggtagag atttaacatt acacgctgaa 5400
 atattctttg atggtgaaac aacaccaatt agaaaagata cgacttacaa acttagtcaa 5460
 tctattccaa agcaaatata tgaaacaact atcaatgggtc gatttaattc atcaggtgat 5520
 gcatatccag gaaattttgt tcaagcagta aatcaatatt ggccagaaca tatggacttc 5580
 agatggggccc aaggatcagg cacaccaagt tctcgtaatg caggttcatt tactaaaaca 5640
 gttacggtag tttatcaaaa cggccaaact gaaaacgtta atgtactatt caaagtcaaa 5700
 ccaataaac ctgttattga tagtaaatgt gtgatttcaa aaggacaatt aaatgggtcaa 5760
 caaatttttag ttcgaaatgt tccacaaaat gcacaagtca ctctatatca atcaaatgga 5820
 actgttattc ctaatacaaa tacaactata gattctaatt gtatagctac tgtaacaatt 5880
 caagpcactc taccaaccgg aatattact gctaaaacct caatgacaaa taatgtaacg 5940
 tacactaac aaaatagtag tggaattgct tcaaatataa ctgaagatat aagtgttttt 6000
 tcagaaaaca gtgatcaagt aaatgttacc gctggcatgc aagctaaaaa tgatggtatt 6060
 aaaataatta aaggtacaaa ctataatttt aatgacttca atagtttcat aagtaataa 6120
 ccagccatt ctactcttac atggaacgag gagcctaata gttggaaaaa caacatcggt 6180
 actacaacaa aaactgttac agttactcta cctaatacct aaggtacgag aactgtagat 6240
 attccaataa caatctatcc aacagttaca gctaagaatc cagtaagaga tcaaaaagga 6300
 cgaaacttaa ccaatgggtac tgacgtttat aattatatta tttttgaaaa taataaccgt 6360
 cttggaggaa cagcttcttg gaaagacaat cgtcaacctg ataaaaacat agccggtgta 6420

AM101548_Staph_Epi.5T25

• 00217

caaaatttaa ttgcacttgt taattatcct ggcataatcta caccattaga agttcctgtt 6480
 aaagtgtggg tatataattt tgatttcact caacctatct acaaaattca agtaggagat 6540
 acattcccta aaggaacatg ggcaggctat tacaacatc ttgaaaatgg agagggatta 6600
 ccaatagatg gttggaaatt ttattggaac cagcaaagta caggaaactac tagtgatcaa 6660
 tggcaatcat tagcatatac tagaactcct tttgttaaaa ctggtactta tgatgtcgtt 6720
 aatcctagca actgggggtgt ttggcaaaca tcacaatcag ctaaaatttat agttacaaat 6780
 gctaaaccta atcaaccaac cataactcag tctaaaactg gtgatgtaac agtaacacct 6840
 ggtgctgtgc gtaatatact aataagtggg acaaatgatt atatccaagc atctgcagat 6900
 aagattgtta ttaataaaaa tggaaataaa ttaactacat ttgttaagaa taatgatggt 6960
 cgttggactg ttgaaactgg gtcacctgac ataaatggta tcggaccaac aaataacgga 7020
 actgctatat ctttaagtcg attagcagtt agacctgggg attcaataga agcaatagcg 7080
 actgaagggt ccggagaaac tataagtact tcagcaacta gtgaaattta tattgtcaaa 7140
 gctccacaac ctgaacaagt agcaactcat acttatgata atggaacatt cgatatatta 7200
 cctgacaatt cacgtaattc tttaaatcca actgaacgtg tcgaaattaa ttacactgaa 7260
 aaattaaatg gcaatgaaac acaaaaatca ttcactatta ctaaaaataa caacggcaaa 7320
 tggacgataa ataataaacc aaattatgtc gagttcaatc aggataatgg taaagttgta 7380
 ttttcggcca atacaattaa acctaattct caaattacaa taactcctaa agcaggctcag 7440
 ggttaactg aaaacacaaa tcctactgta attcaagcac ctgcgcaaca tactttaaca 7500
 atcaatgaaa ttgttaagaa acagggtcaa aatgtgacta atgatgatat taataatgcg 7560
 gttcaagtgc caataaaaa tagagttgcy attaacaag gaaacgctct tccaacaaat 7620
 ttagctggtg gtagtacatc acatattcca gtagttattt attacagtga tggagttct 7680
 gaagaagcta ctgagactgt tagaactaaa gttaataaaa ccgaattaat caatgctcgt 7740
 cgtcactag atgaagaat tagtaagag aacaaaacac catcaagtat cagaaacttt 7800
 gatcaagcta tgaatcgtgc tcaatcacia attaatacag ctaaaagtga tgctgaccaa 7860
 gttataggca cagaatttgc aacacctcaa caagtaaatt cagctttatc taaagttcaa 7920
 gcggcacaaa ataaaataaa tgaagctaaa gcattattac aaaacaaggc tgataatagt 7980
 caacttgtga gagcaaaaga acaattacaa caatcgattc aaccagccgc ttcaactgat 8040
 ggtatgactc aagatagcac aaggaactac aaaaataaac gccaaagcagc tgaacaagca 8100
 atacaacatg caaatagcgt tataaataat ggagatgcaa catcccaaca aattaatgat 8160
 gctaaaaaca cagttgaaca ggcacagaga gattatgttg aagctaaaag caacttacgt 8220
 gctgataagt cacagttaca aagcgcttat gatacgtaa atagagatgt ttaacaaat 8280
 gataaaaagc cagcatctgt aagacgctat aatgaagcca ttcaaatat tagaaaagaa 8340
 ttagatacag ctaaagcggg tgcaagtagt actttgcgaa acaccaatcc ttccgttgaa 8400

AM101548_Staph_Epi.ST25

caagttagag acgctttaaa taaaataaat actgttcaac ctaaagtga tcaagcaatt 8460
gctttacttc aaccaaaga aaataattca gaacttgtag aagctaaaa acgtttacaa 8520
gacgctgtaa atgacatacc tcaaacacaa ggtatgacac aacaaacaat taataattat 8580
aatgacaaac aacgtgaagc tgaaagagca cttacatctg cacaagagt gattgataat 8640
ggggatgcta caactcaaga aattacttct gaaaaatcta aagtagagca agcaatgcaa 8700
gctttaacta atgctaaaag taatctgaga gctgataaga atgagttaca gactgcatat 8760
aacaataaa ttgagaacgt atctaccaat ggtaaaaaac cggcgagtat acgtcaatac 8820
gaaacagcca aagccagaat acaaatcaa attaagtatg ctaaaatga agcggagcga 8880
attttaggta atgataatcc acaagtatca caagtaactc aagcattgaa caaatcaaa 8940
gctattcaac caaattaac agaagctatc aacatgctc aaaacaaaga aaataataca 9000
gaattagtca atgctaaaa cagacttgaa aatgcagtaa atgatacaga tccaacacac 9060
ggtatgactc aagaaacaat taataattac aacgctaaa agcgagaagc tcaaatgaa 9120
atacaaaaag cgaacatgat tattaataat ggagatgcta ctgctcaaga ttttcttet 9180
gaaaaatcta aagtagagca agtattacaa gcattacaaa atgctaagaa tgacttaaga 9240
gctgataaaa gagaattaca gactgcatac aataaactta taaaaatgt taataccaat 9300
ggtaaaaaac catctagtat tcaaaactat aagtctgcaa gacgaaatat cgaaaaccaa 9360
tataataccg ctaaaatga agcacataat gttcttgaaa atacaaacc tactgtaaat 9420
gcagtagaag atgctttacg taagataaat gcaattcaac cagaggttac aaaagctatt 9480
aatatacttc aagataaaga agataatagc gaacttgta gagcaaaaga aaaattagat 9540
caagcgatta atagtcaacc atcactaat ggtatgactc aagaatctat taataattac 9600
acaacaaaac gtagagaagc acaaatata gcaagtctg ctgacactat tattaataat 9660
ggggatgcat ctattgaaca aataacagaa aataaattc gagttgaaga ggcaactaat 9720
gcacttaacg aagcaaaaca acatttaacg gcagatacaa cttctttaaa aactgaagta 9780
cggaaattaa gtaggagagg cgacacaaac aacaaaagc ctacagtggt tagtgcttat 9840
aacaatacta ttcattcgct acaatctgaa attacacaga ctgaaaatag agcaataact 9900
atcatcaata agcctattcg ttctgttgaa gaagtaata atgcattgca tgaagtaaac 9960
caattgaacc aacgcttaac agatacaatt aacttattac aacctttagc gaataaagaa 10020
agcttaaaag aagctcgtaa tcgacttgaa agtaaaatta atgaaaccgt tcaaacagac 10080
ggtatgactc aacaatctgt tgagaattat aagcaagcta aaataaaagc tcaaatgaa 10140
tctagtattg cacaactct tattaataat ggtgatgcat ctgatcaaga agtttctaca 10200
gaaatagaaa aattaatca aaagctgtct gaattaacaa attcaatcaa tcaactaaca 10260
gttaataaag aacctttaga aactgccaaa aatcagttac aagcaaatat tgacaaaaa 10320
cctagcactg atggtatgac gcaacaatct gtacaaagct atgaacgtaa actacaagaa 10380
gccaaagata aaataaactc aattaataat gtcttagcta acaatccaga tgttaatgct 10440

AM101548_Staph_Ep1.ST25

. 00219

atcagaacaa acaaagtga gacggaacaa atcaataatg aattaacaca ggcgaaacaa 10500
 ggtcttactg ttgataaaca accattgatt aatgcaaaaa ctgctttgca acaaagtcta 10560
 gataatcaac caagtactac tggatatgact gaagcaacaa ttcaaaatta taacgctaaa 10620
 cgtcaaaaag cagagcaagt tatacaaaat gcaaaataaa ttattgaaaa cgctcaacct 10680
 agtgtacaac aagtgtctga tgagaaatct aaggtagagc aagcactcag tgaattgaac 10740
 aacgccaaat cagcgcttag agctgataaa caagaattac agcaagcata taatcagttg 10800
 attcaaccaa cggatttaaa taataagaaa ccagcttcta tcaactgcgt caatcaaaga 10860
 tatcaacaat ttagtaacga attgaacagc actaaaacaa atacagatcg cattttaaaa 10920
 gagcaaaatc caagtgtagc tgatgtcaac aatgactaa ataaagtaag agaagtacaa 10980
 caaaaattaa acgaagccag agcactttta caaaataaag aagataatag tgcactagtt 11040
 cgagccaaag aacaacttca acaggcagtt gaccaagtc cttcaacaga aggtatgacg 11100
 caacaacta aagatgatta caattcaaaa caacaagctg ctcaacaaga aatatcaaaa 11160
 gcacaacaag ttatcgataa tggcgatgag actacacaac aaattttcta cgccaaaaca 11220
 aatgttgaac gcgctttaga agcattaaat aatgcaaaaa ctggtttaag agcagataaa 11280
 gaggaacttc aaaatgcata taatcaatta actcaaaata ttgatacgag cggtaaaacg 11340
 cctgcaagta tcaggaaata caatgaagct aagtcacgta ttcaaaacta aattgattca 11400
 gctaaaaatg aagcaaacag tattttaaca aatgacaatc ctcaagtatc acaagtgact 11460
 gctgcgttaa acaaaataaa agctgttcaa cctgaattag ataaagcgat agcaatgctt 11520
 aaaaataaag agaataataa tgcattgggt caagcgaac aacaacttca acaaatgtt 11580
 aatgaagtag atccaacaca aggcattgaca acagatactg ctaataacta taaatcaaaa 11640
 aaacgtgaag ctgaagatga aatacaaaaa gctcaacaaa tcattaacaa tggcgatgcc 11700
 actgagcaac aaattactaa cgaacaaat agagtaaact aagcgattaa tgcaataaac 11760
 aaagccaaaa acgatttacg tgctgataag tctcaattgg aaaatgctta taaccaatta 11820
 atacaaaatg ttgatacaaa tggtaaaaaa cctgctagta ttcaacaata ccaagctgct 11880
 cgacaagcta ttgagacgca atacaataac gctaaatcag aagcacatca aattcttgaa 11940
 aatagtaacc cttcagttaa tgaagtagca caagcattac aaaaagtga agctgtacaa 12000
 cttaaagtta atgacgcgat tcatatactt caaaataaag ataataatag tgcacttgct 12060
 acagctaaaa atcaacttca gcaatcagtt aatgatcaac cattaacaac aggtatgact 12120
 caagattcta ttaataacta tgaagctaag agaaatgagg ctcaaagtgc tatcagaaat 12180
 gcagaagctg tcatcaacaa tggcgatgca actgcaaac aaatttcaga cgagaaatct 12240
 aaagttgaac aagcactagc acatttgaat gatgctaacc agcaattaac tgcagatact 12300
 actgaattac aaacagcagt tcaacaatta aacagaagag gcgatacaaa taataaaaag 12360
 ccaagaagta tcaatgcata taataaagca attcaatcat tagaaacaca aattacttct 12420

170
nn22g

AM101548_Staph_Epi.ST25

gctaaagata atgccaacgc tgtgatacaa aaacctatac gtactgttca agaggtaaatt 12480
aatgcattac aacaagtaaa tcagttgaat caacaattaa ctgaagcaat taatcaactt 12540
caaccgctat caaataatga tgcattaaaa gctgcaaaat taaatttaga aaataaaatt 12600
aatcaaaactg tacaactga tggatgaca caacaatcta tagaggctta tcaaaacgct 12660
aaacgcgtag cccaaaatga atctaact gcttttagcat taattaataa cggcgatgcc 12720
gatgaacaac aaattacaac tgaacagac cgagtcaatc agcaactac aaacttaact 12780
caagcaatta acgggttaac agttaataaa gaaccattag aaaccgctaa aacagcgтта 12840
caaaataaca tcgaccaggt acctagtaca gatggtatga ctgagcaatc tgttgcaaatt 12900
tataatcaaa aactacaaat agctaaaaac gaaattaaca caattaataa cgttttagcg 12960
aacaatccag atgttaatgc aatcaaaacg aataaagcag aagcggaacg aatcagtaac 13020
gatttaacac aagctaagaa taacttacaa gttgatactc aacctttaga aaaaataaaa 13080
agacaacttc aagatgaaat tgatcaaggт actaacacag atggaatgac tcaagattca 13140
gtggataatt acaatgatag cttagtgc gcaattatag aaaaaggcaa agtaataaaa 13200
ttacttaaac gtaatccgac agtagaacaа gttaaagaga gcgttgctaa tgcacaacaa 13260
gtcatacaag atttacaaaa tgctcgaact tcacttgttc cagacaaaac tcaacttcaa 13320
gaagctaaaa atagattaga aaacagtatt aaccaacaaa cagatactga cggcatgact 13380
caagattcgc ttaacaatta taatgataaa ttagcaaaag ctagacaaa ccttgaaaaa 13440
atatctaаag ttttaggtgg tcaacctact gtagctgaa ttagacaaa tacagatgaa 13500
gcaaatgcac ataaacaagc attagacact gcacgttctc aacttacatt aaatagagag 13560
ccatatatca atcatattaa таатгаагт catttaata acgcgcaaaa agataatttt 13620
aaagctcaag ttaactcagc acctaatcat aatactttag aaacgattaa aaataaggct 13680
gatactttaa atcaatctat gacagcatta agtgaaagta ttgcagatta cgaaaatcaa 13740
aaacaacaag aaaattattt agatgcattt aacaataaac gtcaagacta tgacaatgca 13800
gtcaatgcgg ctaaaggтat tttaaaccaa actcaaagtc cgacaatgag tgctgatgtg 13860
attgatcaaa aagctgaaga tgttaaacgt acgaaaactg cgttagatgg aatcaaaga 13920
ttagaagttg ctaacaaca agcacttaat catttaata ccttaaatga tttaaacgat 13980
gctcagcgac aaactttaac tgatactata aatcactctc caaacatcaa ttcagtgaat 14040
caagctaаag aaaaagctaa tactgttaac acagcaatga ctcaactgaa acaaactatt 14100
gctaactatg acgatgaatt gcatgacggc aattacatta atgcagataa agacaaaaaa 14160
gatgcttata атаасггтг таасаатггт аасааггга ттаатсаатс тгагггтаат 14220
caagcacaac ttgatccagc tgaattaat aaagttacac aaagagtcaa tacgactaaa 14280
aatgatctaa atggtaatga caattggct gaagctaaaa gagatgctaa tacaaccatt 14340
gatggtttaa cttatctaaa tgaagctcaa cgtaacaaag ctaaagaaaa tgtaggcaaa 14400
gcttctacaa aaacaatat tacpagtcag ttacaagatt acaatcaatt gaatattgct 14460

AM101548_Staph_Epl_ST25

.m 00221

atgcaagcat tacgtaacag tgtgaacgac gttaacaatg ttaaagcaaa tagcaattat 14520
ataaatgaag ataatggtcc aaaagaagct tacaatcaag ccgttactca tgctcaaaca 14580
ttgataaatg cacaatctaa ccctgaaatg agccptgacg tagtaaatca aaaaacacaa 14640
gcagtaaata ctgcccata gaatttacat ggacaacaaa agttagaaca agcacaaagt 14700
agtgctaata cagaaatcgg taacttacca aacttaacta atactcaaaa agctaaagaa 14760
aagguaactgg taaatagtaa acaaaactcgt acggaagtag aagaacaact taaccaagct 14820
aagtcaactag atagttctat gggcacgtta aaatcattag ttgctaaaca acctacagta 14880
caaaaaacaa gtgttttatat taacgaagat caacctgagc aatctgccta caatgattcc 14940
attacaatgg gacaaactat aattaataaa acagctgacg cagtacttga taaaacttta 15000
gttgataacg caatcagtaa catttcaact aaagagaatg cactgcatgg tgaacaaaaa 15060
ttaacaactg ctaaaacgga agcaattaat gcacttaata cattagctga tttaaacaca 15120
cctcagaaag aggctattaa aacagctatt aacactgctc atacaagaac tgatgtaact 15180
gcagagcaaa gtaaggctaa tcaaataaat agtgcaatgc acacgttgag acaaaacatt 15240
tctgacaacg aatcagtaac aaacgaaagt aattatatta acgctgaacc cgaaaaacaa 15300
catgccttta ctgaggctct aaataatgct aaagaaatag ttaatgaaca acaagccact 15360
cttgatgcca attcaattaa ccaaaaagca caagcgattc ttactactaa aaatgcttta 15420
gatpgtgaag aacaattacg tctgtctaaa gaaatgccg atcaagsaat caatacgtta 15480
aatcaattga ctgatgcga aagaaatagt gaaaaggtt tagtcaacag ttctcaaact 15540
agaacagaag ttgcttctca attagcaaaa gctaaagaac taaataaggt gatggaacaa 15600
ctgaatcacc ttatcaatgg taaaaaccaa atgataaata gcagttaaatt tatcaatgaa 15660
gatgcgaacc aacaacaagc atattcaaat gcgattgcaa gtgcagaagc gcttaaaaac 15720
aaatcacaaa accctgaatt agataaagta acaattgaac aagcaattaa taatattaat 15780
tctgcaatta acaatctaaa cgtgaagct aaactgacta aagctaaaga agatgctgtt 15840
gcttcaataa acaacctaag cggattaaca aacgagcaaa aaacaaaaga aaatcaagcc 15900
gttaatggcg ctcaaactag agaccaagtt gctaataaat tacgtgatgc tgaagcatta 15960
gatcaatcaa tgcaaacatt acgtgactta gttaacaatc aaaatgcaat acattcaaca 16020
agtaattatt ttaacgagga ttcaactcaa aagaatactt atgataatgc aattgataat 16080
ggctcgacat atataactgg tcaacacaat ccagaattaa ataaatctac tattgatcaa 16140
acgattagcc gaattaacac agctaaaaat gatttacatg gtgtagaaaa gttacaaaga 16200
gataagggaa ctgctaatac agaaattgga caattaggtt atttaaatga cctcaaaaa 16260
tctggtgagg aatccttagt caacggttca aatacacgtt ctgaagtaga agagcatctt 16320
aatgaagcta aatcattaaa taatgcaatg aaacaattaa gagataaagt agctgaaaag 16380
actaatgtca aacaaagtag cgattacatt aatgattcaa ctgaacatca acgtgggtat 16440

727

nn222

AM101548_Staph_Epi.ST25

gatcaagcac ttcaagaagc agaaaatatt attaatgaaa tcggtaatcc aacattaaat 16500
aatcggaaa ttgaacaaaa gttacaacaa ttgactgacg ctcaaatgc gttacaaggt 16560
tcacatctat tagaagaagc taaaaataat gcgattactg gaatcaataa acttacagca 16620
ttaaatgatg cacaacgtca aaaagcaatt gaaaatgttc aagcacagca gacaatccca 16680
gcagttaatc aacaattaac tttggataga gaaataaata ctgcaatgca agctttacga 16740
gataaagtag gccaacaaaa taacgttcac caacaagta attatttcaa tgaagatgaa 16800
caacaaaaac ataactatga taattctgta caagccgggc aaactattat tgataaactt 16860
caagatccaa tcatgaacaa aatgaaatt gagcaggcta ttaatcaat caatagcact 16920
caaacagcgt taagtggaga aaataaatta cacactgacc aagaaagcac aatagacaa 16980
atagaagggt tatctagttt gaacacagct caaatcaacg ccgaaaaaga tttagtcaat 17040
caagctaaaa caagaacaga tgttgctcaa aagttagctg cagctaaaga aataaattct 17100
gctatgagta atttaagaga tggcattcaa aataaaggag acatcaaacg tagcagtgc 17160
tatatcaacg cagatccgac taaagttaca gcttacgac aagcactaca gaacgcagaa 17220
aatatcatca atgccacacc aaacgtagag cttaataaag ctacaattga acaagcgcta 17280
tcacgcgttc aacaagcaca acaagatctt gatgggtgtc aacaattagc taatgctaaa 17340
caacaagcta cacaaactgt caatgggtta aatagcttaa atgacgggtca aaagcgtgaa 17400
ttaaatctat taattaattc agctaatacc cgtacaaaag tacaagaaga attaaacaaa 17460
gcaactgaat tgaaccatgc gatggaagct ttaagaaaca gtgttcaaaa cgttgatcaa 17520
gtaaacaaa gtagcaatta tgtcaatgaa gatcaacctg aacagcaca ttatgataat 17580
gctgtcaatg aagctcaagc tacaatcaac aacaatgctc aacctgttct agacaaatta 17640
gctatagaac gtttaactca aactgttaac actacaaaag atgcattaca tgggtgctcaa 17700
aaactgacac aagaccaaca agctgctgaa actggaatac gtggtttaac gagtctcaat 17760
gaacctcaga aaaatgctga agtagctaaa gtaactgcag caacaacacg tgatgaagtg 17820
agaaatattc gtcaagaagc aacaacatta gatactgcaa tgcttggttt acgtaaaagc 17880
attaaagata aaacgatac taaaaatagt agtaaatata ttaatgagga tcatgaccaa 17940
caacaagctt atgacaatgc tgtaaataat gctcaacaag ttatcgatga aactcaagca 18000
acgttaagct cagatacaat caatcaattg gcaaatgccg taactcaagc taaatctaata 18060
cttcattggag atactaaact acaacacgat aaagatagtg ctaaacaaac gattgctcaa 18120
ttacagaatt tgaattcagc tcaaaaacat atggaagatt cttaattga taatgaatct 18180
acacgtacgc aagtcacaac cgatttaaca gaagctcaag cttagatgg ttaaatgggt 18240
gccttaaaag aaagtattaa agattatact aatattgttt caaacggtaa ttacatcaat 18300
gcggaacct ctaagaaaca agcatatgat gcagctgtac aaaatgctca aaatataata 18360
aatggaacga atcaaccaac aattaataaa ggtaatgtca ctacagcaac acaaacctgt 18420
aaaaatacta aagatgcctt agacgggtgat catagattag aggaagctaa aaataatgcc 18480

AM101548_Staph_Epi.ST25

aatcaaacaa tcagaaatct atctaatttg aacaatgccc aaaaagatgc agagaaaaat 18540
ctagttaata gcgcatcaac attagaacaa gttcaacaaa acttacaac cgctcaacaa 18600
ttagataatg ctatgggtga gttacgacaa agtattgcta aaaaagatca agtgaaagca 18660
gatagtaaat atctaaatga agatcctcaa attaagcaaa actatgatga tgcagttcaa 18720
cgtgttgaaa ctattattaa cgaaactcaa aacctgaat tacttaaagc aaacattgac 18780
caagcaactc aatccgttca aaatgcagaa caagctttac atggtgctga aaaattaaat 18840
caagacaaac aaacgtcttc gacagaacta gatggattaa cagatttaac agatgcacaa 18900
cgtgaaaaac tcagagaaca aattaacact tctaatagta gagatgatat taagcaaaaa 18960
attgagcaag caaagcact aaatgacgca atgaaaaaac ttaaagaaca agttgcgcaa 19020
aaagatggtg ttcattgctaa cagtgattat acaaatgaag attctgcaca aaaagatgcg 19080
tataataatg cacttaaaca agcgggaagc attattaata acagctcaaa tcctaactta 19140
aatgcacaag acattactaa tgctttaaat aatattaac aagcacaaga taaccttcat 19200
ggagctcaaa aattacagca agacaaaaat acaactaatc aagccattgg taacttaaat 19260
catcttaatc aacctcaaaa agatgcgctt atacaagcta ttaatggagc tacatctagg 19320
gaccaagttg cagaaaaact taaagaggcc gaagcgcttg atgaagctat gaaacaactt 19380
gaagatcaag tgaatcaaga tgatcaaatt tcaaatagca gccatttcat aaatgaagac 19440
tcagacaaac aaaaaactta taatgataaa atccaagctg caaagaaat aattaatcaa 19500
acatctaate caaccttaga taaacaaaaa attgctgata cacttcaaaa tattaagat 19560
gcagtgaata atttcatgg tgatcaaaaa ttagctcaat ctaacaaga tgctaataat 19620
caattaaatc atttagatga ctttaaccgaa gaacaaaaaa accattttaa accgttaatt 19680
aataatgctg atactcgaga tgaggtaat aaacaactag agattgctaa acaattaaat 19740
ggtgatatga gtacacttca taaagtcata aatgataaag atcaaattca acatttaagc 19800
aattacatta atgctgataa tgataaaaaa caaattatg ataatgctat taagaagct 19860
gaggatttaa ttcataatca tccagataca ttagatcata aagcattaca agatttatta 19920
aacaagatag accaagcgca taacgaatta aatggagaat ccagatttaa acaggcttta 19980
gacatgctt taaacgacat agatagctta aacagtctca atgttcaca acgcaaact 20040
gttaaggata acatcaacca tgtgacaact ctagaagtt tagctcaaga attgcagaaa 20100
gcaaaagagc ttaatgatgc tatgaagca atgagagata gcattatgaa tcaagagcaa 20160
attcgtaaaa atagcaatta tactaatgaa gacttagctc aacaaaatgc ctataatcat 20220
gcagtagata aaataaataa cattattggt gaagacaatg cgacgatgga tcctcaata 20280
atcaacaag caactcaaga tataaataca gctataaatg gattaaatgg agatcaaaaa 20340
cttcaagatg caagacaga tgctaaacaa caattacta actttactgg ttttaactgaa 20400
ccacaaaaac aagcattgga aaacatcatt aaccaacaa caagcagagc aaatgttgct 20460

12

nn294

AM101548_Staph_Epi_ST25

aaacagttaa gtcattgctaa attcttaaat ggaaaaatgg aagaattaaa agttgcagta 20520
 gccaaagcgt cattagtaag acaaaatagt aactatatta atgaagatgt ctctgaaaaa 20580
 gaagcatatg aacaagctat cgcaaaaggt caggaaataa ttaattcaga aaataatcca 20640
 acaataagta gtactgatat caatcgtagc attcaagaaa ttaatgatgc tgaacaaaat 20700
 cttcatgggtg ataataaatt aagacaagca caggaaattg caaagaatga aatacaaaaat 20760
 ctagacggat taaattcagc tcaaataaca aaattaatcc aagatatagg cagaacaaca 20820
 actaaacctg cagtaactca gaaactagaa gaagcaaaaag caataaacca agctatgcaa 20880
 caacttaaac aaagtatagc cgataaggat gctactctaa attctagtaa ctatctcaat 20940
 gaagattctg agaaaaagtt agcgtacgat aatgctgtaa gccaaagctga acaactcata 21000
 aatcaactta acgacccaac tatggatata agtaatatc aagctattac tcaaaaaggctc 21060
 attcaagcaa aagattcatt gcacgggtgcg aataaacttg cacaaaatca agcagattca 21120
 aatttaataa taaatcaatc aacaaattta aatgataaac aaaagcaagc attaaatgac 21180
 ttaattaatc atgctcaaac taaacagcaa gtggcagaaa taattgcaca agctaataag 21240
 ttaaataacg aaatgggcac actaaaaaca ctctagaaag aacagtcaaa cgttcatcaa 21300
 caaagtaaat atattaatga agatccgcaa gtccaaaata ttataatga ctccattcaa 21360
 aaaggtcgag aaatattaaa cggcactaca gatgatgttt taaacaacaa taaatagca 21420
 gatgccattc aaaacattca tttaactaaa aacgatttac atggtgatca aaaattacaa 21480
 aaagcacaac aagatgcaac caatgaatta aactatttaa caaatctaaa caattctcaa 21540
 agacaaagcg agcatgatga gattaactct gtccttcaa gaactgaagt ttctaattgat 21600
 ttaaatcatg ctaaagcact taatgaagct atgcgtcaac ttgagaatga agttgctctt 21660
 gaaaacagtg ttaaaaaatt aagcgacttt atcaatgaag atgaagcggc acaaaatgaa 21720
 tatagtaatg cacttcaaaa agctaaagac attatcaacg gcgttccaag tagcacttta 21780
 gataaagcta caattgaaga tgctttatta gaattgcaaa atgctagaga aagtttacat 21840
 ggtgagcaaa aacttcaaga ggctaaaaat caagctgttg ctgaaattga taatttaca 21900
 gcattaaatc ctggacaggt tcttgctgaa aaacattag ttaaccaagc atcaaccaa 21960
 ccagaagttc aagaagcctt acaaaaagca aaagaactta atgaagctat gaaagcactg 22020
 aaaactgaan taaataaaaa agaacaatc aaggctgata gtagatatgt aaatgctgac 22080
 agtggctctc aagcaaatta caattctgag ttaaattatg gttctcaat tattgcaact 22140
 acccaaccac .cagagcttaa taaagatgta ataaatagag caactcaaac gattaaaact 22200
 gctgaaaata atttaaatgg gcaatctaaa ttagcagagg ctaagtcaga cggaaatcaa 22260
 agcatcgaac atttgcaagg attaacacaa tcacaaaaag ataaacaaca tgatttaatt 22320
 aatcaagctc aaactaaca acaggtagat gatatcgtaa ataactctaa acaattagat 22380
 aactctatga atcaactaca acaattgtt aacaatgaca atacagtaaa acaaaatagt 22440
 gatttcatta atgaagattc cagccaacag gatgcttata atcatgcaat tcaagcagca 22500

AM101548_Staph_Epi.ST25

aaagatttga taactgctca tcctactatc atggataaaa atcaaataga tcaagctatt 22560
 gaaaatatca aacaagcact taatgattta cacgptagta ataaactatc agaagataaa 22620
 aaagaagctt cagaacaact acaaaacctt aatagcttga cgaacgggca aaaagatacg 22680
 attttaaatc atattttcag tgcaccaaca agaagccaag taggagaaaa aattgcaagt 22740
 gctaaacaat taaataatac aatgaaagca cttagagatt ctattgctga taataatgaa 22800
 attttacaaa gtagtaagta cttcaatgaa gattctgaac aacaaaatgc ttataatcaa 22860
 gccgtaaata aagctaaaaa tataattaat gatcaacca caccagtaat ggcaaatgat 22920
 gagattcaaa gtgtcctaaa tgaagttaaa caaactaaag ataatttaca tggatgatcaa 22980
 aaacttgcta acgacaagac agatgcccaa gcaacattaa atgctgttaa ttacttaaat 23040
 caagcgcaaa gaggtaatct tgaactaaa gtcaaaaact ctaattctag accagaagta 23100
 caaaaagtag ttcaattagc aatcaactt aatgatgcga tgaaaaaatt agatgatgct 23160
 ttaactggta atgacgcaat aaaacaaacg agtaattata ttaatgaaga tacttctcaa 23220
 caagttaact ttgatgagta tacagataga ggtaaaaaca tagttgctga acaaacaaat 23280
 ccaaatatgt ctccaactaa tattaacact attgctgata aaattactga agctaaaaat 23340
 gatttacatg gcgtacaaaa actagaacaa gctcaacaac agtccatcaa tactattaat 23400
 caaatpactg gtctaaacca agctcaaaaa gaacaattaa atcaagaaat tcaacaaact 23460
 caaaccctgt ctgaagtaca tcaagtaatt aaaaaagcac aagctttaa tgaattcaatg 23520
 aatactttac gtcaaagtat cactgatgag aatgaagtta aacaacaag taactacatc 23580
 aatgaaactg ttggtaatca aactgcatat acaaatgccg ttgatcgtgt aaaacaaata 23640
 atcaatcaaa catctaattc aactatgaat cctttagagg tggaaactgc aacatcaaat 23700
 gtaaaaactt ctaaagatgc acttcattgt gaacgtgaat tgaatgacaa taaaaattca 23760
 aaaacttttg cagtcaatca cttagataac ctcaatcaag ctcaaaaaga agcattaact 23820
 catgaaattg aacaagcaac tatagtttca caagtazata atatctataa caaagcgaaa 23880
 gctttaaata atgatatgaa aaaacttana gatatcgttg ctcaacaaga taatgtgaga 23940
 caatcaaca attatataaa cgaggatagt acacctcaa atatgtacaa cgatacaatt 24000
 aatcatgcac aatcaatcat tgatcaagta gcaaaccta cgatgtctca tgacgaaata 24060
 gagaatgcaa tcaataacat aaagcatgcc atcaatgcac tcgatggaga acataaatta 24120
 caacaagcaa aagaaaatgc aaacttattg attaatagtt taaacgattt aatgcacca 24180
 caaagagatg ccataaatag attggttant gaagctcaa caagagaaaa agtagctgaa 24240
 caacttcaa gtgtcaagc tctaaatgat gctatgaagc atttaagaaa cagcattcaa 24300
 aatcaatcat ccgtaagaca agagagcaa tatattaatg caagtgatgc taaaaagag 24360
 caatataatc acgcagttag agaagtcgaa aatattatca atgaacaaca tccaacattg 24420
 gataaagaaa taattaagca actaacggat gctgtaaatc aagcgaataa tgacttaaat 24480

123

nn226

AM101548_Staph_Epi_ST25

```

ggcgttgaat tattagatgc tgataagcaa aacgcacatc aatcgatacc tacattgatg 24540
cacttaaatc aagcacaaca aaacgcatta aatgaaaaaa ttaataacgc agttaccaga 24600
gctgaagtgt cggctattat tggccaagca aaaatactcg atcatgctat ggagaattta 24660
gaagaaagta tcaaagataa agagcaagtc aaacagtcaa gtaactatat taatgaagac 24720
cctgatgttc aagaaacata caataacgcc gttgatcatg tgacagaaat acttaatcaa 24780
acagtaaatc caactttatc tattgaagat atagagcatg ctatcaacga agttaatcaa 24840
gcgaaaaaac aactcagagg taaacaaaaa ctttatcaaa ctatcgattt agctgataaa 24900
gaattaagta aattggatga ttaacatca caacaaagca gttcaatata taatcaaata 24960
tatactgcta aaacpagaac agaagtgtcc caagcaattg aaaaagcaaa atcattaaat 25020
catgcaatga aagcacttaa caaagtatat aaaaatacag ataaagtgtt agatagtagt 25080
cgattcatta acgaagatca acccgaaaaa gaggcgtatc aacaagctat aaatcacgtt 25140
gattcaatca ttcatagaca aacaaatcct gaaatggatc caacagtaat caatagcata 25200
actcatgaac tcgaaacagc tcaaaataac ttacatggtg atcagaaact tgctcatgca 25260
caacaagatg ccgctaattgt aattaatggt ctaattcatc ttaatgttgc tcaacgcgag 25320
gtaatgataa atgcgaatac aaatgctaca acacgcgaaa aagttgcaaa gaacttagat 25380
aatgctcaag ctcttgataa agctatggaa acactacaac aagtagttgc tcataaaaat 25440
aatatattga acgatagtaa atatttaaat gaagattcaa aatatcaaca acaatacgat 25500
cgagttgttg ctgacgccga acaactactt aatcagacaa caaatccaac attagaacct 25560
tataaaatcg atattgttaa ggataatgtc ctagctaacg aaaaaatact atttggcgca 25620
gaaaaactat catatgacaa atcaaatgca aatgatgaaa ttaaacatat gaattatctt 25680
aataatgcac aaaagcaatc tataaaagat atgatttctc acgcagcatt aagaactgaa 25740
gttaacaac ttctgcaaca agctaaaacc cttgatgaag ctatgaaatc acttgaagat 25800
aaaactcaag tagtgattac agatactact ttgtctaatt acactgaagc ttcagaggat 25860
aaaagggaaa aagtagacca aactgtatca catgctcaag caatcattga taaaataaat 25920
ggctcaaatg taagttaga tcaagtacga caagcactag aacaattaac tcaagcatca 25980
gaaaacctcg atggtgatca gcgagttgaa gaagctaaag ttcatgctaa tcaacaattt 26040
gaccaattaa cacatcttaa ttcattacaa caacaactg cgaaagaaag tgttaaaaac 26100
gcaacaaaac tagaagaat cgctactgct agtaacgatg ctctggcatt aaacaaagta 26160
atgggtaaat tagaacaatt cattaatcat gctgattctg ttgaaaatag tgataattat 26220
agacaagccg acgacgacaa aattatcgct tatgatgatg cactagaaca tggacaagat 26280
atacaaaaat ctaatgcaac ccaaatgaa gcaaaacaag cgttacaaca attaataaat 26340
gcagaaacat cgttaaatgg ttctgaaaga ttaaatcatg ctagaccacg agcttttagaa 26400
tatattaaat cactagaaaa aataaacaat gctcaaaagt ctgctttaga ggataaagta 26460
acgcaatcgc atgatttatt agaattagaa catcttgtca acgagggcac aaacctcaat 26520

```

AM101548_Staph_Epi.ST25

gacattatgg gtgaattagc taacgcaatc gttaataact atgctccaac caaagcaagt 26580
 ataaattata ttaacgccga taacctacgc aaagataact ttactcaagc tatcaacaat 26640
 gcacgtgatg cactcaacaa aactcaaggc cagaacttag atttcaatgc aattgataca 26700
 tttaaagatg atatattcaa aactaaagat gcacttaacg gtattgaacg tttaacagct 26760
 gcanaatcaa aagcagaaaa actaattgat agtttaaaat ttattaataa agctcaattc 26820
 acacatgcaa atgatgaaat tatgaatact aattctattg cacaattgtc tagaatcgtg 26880
 aatcaagcat ttgattttaa tgatgcaatg aaatctttaa gagatgaact taataataaa 26940
 gcttttcctg tccaagcaag ctcaattat ataaattcag atgaagattt aaaacaacaa 27000
 tttgaccatg ctttaagtaa tgctcgaaaa gtacttgcaa aagaaaatgg taaaaattta 27060
 gatgaaatac aaattgaggg actcaaacaa gtgattgagg atactaaaga tgctttaaat 27120
 ggtatccaac gtttatcaaa agctaaagct aaagcaattc aatcgtaca atctttatct 27180
 tatatcaatg atgcacagcg tcatattgct gaaaataata ttcacaactc tgatgattta 27240
 tcatctttag caatacatt atctaaagct agtgatttag ataatgcaat gaaagactta 27300
 cgagatactc tagaaagtaa ttcaacttct gtccaaata gtgtgaatta tattaatgct 27360
 gataagaatt ttcaattga atttgatgag gcgtacaac aagcaagtgc aacaagttct 27420
 aaaacttcag aaaatccagc aacgattgaa gaagtattag gtcttagtca agccatttac 27480
 gatacaaaaa atgcattgaa tgggtgaacaa cgacttgcaa ctgagaagag caaagatcta 27540
 aaattaataa aaggattaaa agatttaaat aaagcacaac ttgaagatgt cacaacaag 27600
 gtaaattcag caatacttt aacagagtta tctcagctca ctcaatcaac gttaaaatta 27660
 aacgataaaa tgaaattatt gagagataag cttaaaacct tagtaaatcc tgttaaagca 27720
 agtttaaat atagaaacgc tgattataat ttaaaacgtc aatttaacaa agctttaaaa 27780
 gaagctaaag gcatattaaa taaaaatagc ggtccaaatg tcaatatcaa tgacattcaa 27840
 catcttttaa cacaataga taatgctaaa gaccaattaa atgggtgaacg acgtctaaaa 27900
 gaacatcaac aaaaatctga agtatttatt attaaagaat tagatatact taataatgct 27960
 caaaaagctg caataattaa tcagattaga gcgtctaaag acattaaaat aattaatcaa 28020
 atcgttgata atgcaataga attaaatgat gctatgcaag gtttaaaaga acatgtagct 28080
 caattaacag caactacaaa agacaacatt gaatatttaa atgctgatga agaccttaa 28140
 ttacaatatg attacgctat caacttagcg aataatgttc ttgacaaaga aaacggtaca 28200
 aataaagacg ctaatatcat aattggaatg attcaaaaca tggatgatgc tagagcactt 28260
 ctaaattggaa ttgaagact taaagatgct caaacaaaag cacataatga cattaagat 28320
 acgctcaaac gtcaacttga tgaaattgaa cacgctaag caacatcaaa ttctaaggct 28380
 caagcaaac aaatggtaaa tgaggaagct agaaaagcgt tttctaatat taatcacgca 28440
 acatcaaatg atttagtta tcaagcaaaa gatgaagggc aatctgcaat tgaacacata 28500

124

... 00278

AM101548_Staph_Ep1.ST25

catgcagatg aattacctaa agcgaaacta gatgctaatic aaatgattga ccaaaaagtt 28560
gaagatataa atcacttaaat tagtcaaaaat ccaaacttat cacatgatga aaaaaataaa 28620
ctaatatctc aaattaataa gttagttaa atgaaattca acaagctata 28680
aacaacaac aaatagaaaa tgctacaaca aaactagatg aagtcattga aactactaaa 28740
aaattaatta tcgccaaagc tgaagctaaa caagtataa aagagttatc acaaaagaaa 28800
cgagatgcaa taaataacaa cactgattta acaccttctc aaaaggcaca tgcttttagca 28860
gatattgata aaacagaaaa agatgcactt caacatatcg aaaatttctaa ttcaattgat 28920
gatatcaata acaataaaaa gcatgcattt aatacttttag ctcatatcat tatttgggat 28980
actgatcagc aaccattagt ttttgaacta cctgaattga gccttcaaaa tgcttttagta 29040
acaagtgagg tgggtgttca cagagatgaa actatttcat tagaatctat aattggagct 29100
atgactttta ctgatgaact taaagtcaat attgtttcat taccgaacac tgataaagta 29160
gctgatcacc taaccgctaa agttaagggt attttagctg atggctcata tgtcactgta 29220
aatgttccag tcaaagttgt agaaaaagaa ttacaatatg ctaaaaagga tgctataaaa 29280
acaattgatg ttctggtaaa acaaaaaatc aaagatatag attctaataa cgaattaacg 29340
tctactcaac gtgaagatgc aaaagctgaa attgaaagat tgaaaaagca agccatcgat 29400
aaagtgaatc attcaaaatc gattaagat attgaaacag taaaacgaac tgattttgaa 29460
gaaatagatc agtttgatcc taaacgcttt acgctaataa aagctaaaaa ggatatcatt 29520
actgatgtta atactcaaat ccaaatgggt ttcaaagaaa ttgaaacaat aaaaggttta 29580
acttctaang aaaaaactca gtttgataaa caattaactg aactacaaa agaattttta 29640
gaaaaagtcg agcatgctca taatttagta gaattaatc aattacaaca agagttaaat 29700
aatagatata aacatatttt aaaccaagca ctttactag gtgaaaaaca tatagcagaa 29760
cataaattag gatatgttgt agtaacaaa actcagcaa tactaaataa tcaatctgct 29820
tcttacttta taaaacaatg ggcacttgat agaattaac aaattcaact agaaacgatg 29880
aattcaattc gtggtgcgca taccgtacaa gatgtacaca aagcattatt acaaggata 29940
gagcaaatct tgaagtaaa tgtaagtatt ataatcaat ctttcaacga ttccttgcat 30000
aactttaatt atcttcattc aaaatttgat gctagattaa gagaaaagga tgttgcaaac 30060
catatcgtac aaactgaac attcaaagaa gttctaaaag gaacgggtgt tgaaccaggt 30120
aaaatcaaca aagaaacaca gcaaccaaaa cttcataaga atgataatga tagcctattc 30180
aaacatttag ttgataattt cggcaaaact gtaggtgtta ttacattaac tggtttactt 30240
tctagtttct ggttagtttt ggctaaaaga cgtaaaaaag aagaagaaga aaaacaatcg 30300
ataaaaaatc atcacaaga tattcgtctt tcagatactg ataaaataga tccaattgta 30360
ataactaagc gtaaaataga taaagaagaa caaattcaaa acgatgacaa acattcaatt 30420
ccagttgcta aacataagaa atctaagaa aagcaattga gtgaagagga tattcattca 30480
atccccgtcg ttaagcgtaa acaaaacagt gataacaaag atacaaaaca gaagaaagtt 30540

.. 00229

AM101548_Staph_Epi.ST25

acttctaaaa agaagaaaac gcctcaatca actaaaaaag ttgtaaaaac caaaaagcgt 30600
tctaaaaagt aa 30612

COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS DE ANTÍGENOS DE POLIPÉPTIDO**STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS**

na 30

La presente invención se relaciona con composiciones inmunogénicas, que comprenden polipéptidos aislados de *Staphylococcus epidermidis*. La invención también se relaciona con polinucleótidos que codifican polipéptidos *Staphylococcus epidermidis* y su uso en composiciones inmunogénicas. En adición, la invención se relaciona con métodos para inducir una respuesta inmune en mamíferos contra *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* utilizando composiciones inmunogénicas de los polipéptidos y polinucleótidos *Staphylococcus epidermidis*. La invención también se relaciona con métodos para detectar *Staphylococcus epidermidis* en una muestra biológica.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El *Staphylococcus epidermidis* es un componente mayor de la flora microbiana normal en humanos en la piel y la membrana mucosa y se considera una vez solo un contaminante cuando se cultiva de un paciente infectado. Ver Heilmann, C. and G. Peters, *Biology and pathogenicity of Staphylococcus epidermidis*, in *Gram-positive pathogens*, V.A. Fischetti, Editor. 2000, American Society for Microbiology: Washington, D.C. p. 442-449; von Eiff, C., et al., *Lancet Infect Dis*, 2(11): p. 677-85 (2002). Ahora este es ampliamente aceptado por ser un patógeno oportunístico de gran importancia y la causa principal de infecciones del torrente sanguíneo en hospitales. Ver *Am J Infect Control*, 27: p. 520-32

(1999); Diekema, D.J., et al., Int J Antimicrob Agents, 20(6): p. 412-8 (2002); Edmond, M.B., et al., Clin Infect Dis, 29(2): p. 239-44 (1999). Estas infecciones se asocian principalmente con la presencia de un cuerpo de polímero externo continuo tal como un catéter permanente, articulación protésica o válvula cardíaca protésica. Ver Heilmann, C. and G. Peters, *Biology and pathogenicity of Staphylococcus epidermidis*, in *Gram-positive pathogens*, V.A. Fischetti, Editor. 2000, American Society for Microbiology: Washington, D.C. p. 442-449; von Eiff, C., et al., Lancet Infect Dis, 2(11): p. 677-85 (2002). Se piensa que la infección resulta de la introducción de *Staphylococcus epidermidis* en la piel del paciente luego de la inserción del dispositivo protésico. La colonización y posterior formación de biopelícula puede conducir a bacteremia con el potencial para dispersión hematológica a otros sitios en el cuerpo. Estas infecciones son a menudo difíciles de tratar, surgen de la muerte reducida de bacterias dentro de una biopelícula por antibióticos y también un incremento en resistencia antibiótica entre aislados clínicos. Ver Diekema, D.J., et al., Int J Antimicrob Agents, 20(6): p. 412-8 (2002); Edmond, M.B., et al., Clin Infect Dis, 29(2): p. 239-44 (1999); Lewis, K., Antimicrob Agents Chemother, 45(4): p. 999-1007 (2001); Raad, I. et al., Clin Infect Dis, 26(5): p. 1182-7 (1998). Se ha reportado que el *Staphylococcus epidermidis* con susceptibilidad reducida vancomicina. Ver Sanyal, D. and D. Greenwood, J Med Microbiol, 39(3): p. 204-10 (1993); Sanyal, D., et al., Lancet, 337(8732): p. 54 (1991). El tratamiento difícil de estas infecciones necesita el uso de inmunización como un medio para prevenir infección.

La formación de biopelícula es un determinante principal de virulencia para infecciones de *Staphylococcus epidermidis*. Por consiguiente, la investigación en proteínas de superficie de *Staphylococcus epidermidis* se ha enfocado en aquellas proteínas envueltas en formación de biopelícula. Estas proteínas han sido subdivididas en grupos basados en su implicación en las dos etapas principales de formación de biopelícula: 1) acoplamiento primario, proteína-1 de superficie estafilocócica, autolisina (AtlE), Fbe (SdrG) y GehD y 2) acumulación de célula bacterial, proteína (Bhp) homóloga Bap, acumulación de proteína asociada (AAP) y autolisina (AtlE). Ver von Eiff, C., et al., Lancet Infect Dis, 2002. 2(11): p. 677-85; Vuong, C., et al., J Infect Dis, 188(5): p. 706-18 (2003); Veenstra, G.J., et al., J Bacteriol., 178(2): p. 537-41 (1996); Rupp, M.E., et al., J Infect Dis, 183(7): p. 1038-42 (2001); Hussain, M., et al., Infect Immun, 65(2): p. 519-24 (1997); Nilsson, M., et al., Infect Immun, 66(6): p. 2666-73 (1998); Davis, S.L., et al., J Biol Chem, 276(30): p. 27799-805 (2001); and Bowden, M.G., et al., J Biol Chem, 277(45): p. 43017-43023 (2002). Comparativamente se ha ejercido menos esfuerzo hacia la identificación de proteínas de superficie expresadas en la exposición a los factores ambientales dentro del huésped o aquellas involucradas en las interacciones parásito-huésped.

El *Staphylococcus epidermidis* debe experimentar una transición de comensal a patógeno y se debe adaptar a su microambiente dentro del huésped. Para un comensal en la

nn249

transición a patógeno debe ganar acceso al tejido del huésped, mutar sus sentidos a su ambiente, alterar la expresión del gen de modo que es capaz de evadir las defensas del huésped, unirse y adherirse a los factores del huésped, crecer y dividirse en la presencia de nutrientes diferentes y defensas del huésped. Las proteínas en la superficie bacterial hacen un contacto inicial con el nuevo ambiente dentro del huésped. Las muchas funciones de estas proteínas incluyen percepción del ambiente, recoger y transportar nutrientes, defenderse contra el sistema inmune del huésped y unir proteínas del huésped. Las proteínas expuestas a la superficie pueden también servir como punto de contacto o reconocimiento por el sistema inmune del huésped y puede ser objetivo para una respuesta inmune humoral contra la bacteria. Josefsson, E., et al., J Infect Dis, 184(12): p. 1572-80 (2001); Swiatlo, E., et al., Infect Immun, 71(12): p. 7149-53 (2003); Grifantini, R., et al., Nat Biotechnol, 20(9): p. 914-21 (2002). Así, hay una necesidad inmediata para identificar candidatos prometedores entre las proteínas de *Staphylococcus epidermidis* para uso en composiciones inmunogénicas que inducen respuesta inmune a enfermedades originadas por serotipos de *Staphylococcus epidermidis*.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención suministra una composición inmunogénica que comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido que se escoge de una o más de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 32, un equivalente biológico de esta, o un fragmento

de esta. En una modalidad particular, el polipéptido es inmunoreactivo con anticuerpos en el suero de conejos infectados con *Staphylococcus epidermidis*. En otra modalidad, el polipéptido se une a una o más proteínas de suero de conejo.

En ciertas modalidades, la composición inmunogénica adicionalmente comprende un portador farmacéuticamente aceptable. En otras modalidades, las composiciones inmunogénicas de la invención también comprenden uno o más adyuvantes. En todavía otra modalidad, la composición inmunogénica comprende adicionalmente un antígeno de polisacárido de *Staphylococcus epidermidis*. En todavía otra modalidad, la composición inmunogénica adicionalmente comprende un antígeno de polipéptido o polisacárido de *Staphylococcus aureus*.

La presente invención suministra composiciones inmunogénicas, que comprenden un polipéptido aislado de *Staphylococcus epidermidis*.

La presente invención suministra una composición inmunogénica que comprende un polipéptido de *Staphylococcus epidermidis* en donde el polipéptido comprende adicionalmente aminoácidos heterólogos. En una modalidad particular, el polipéptido es un polipéptido de fusión. En otra modalidad, el polipéptido es un polipéptido recombinante. En todavía otra modalidad, la invención suministra una composición inmunogénica que comprende un polipéptido de *Staphylococcus epidermidis* en donde el polipéptido comprende un epitopo de neutralización de

Staphylococcus epidermidis. En una cierta modalidad, el polipéptido es una lipoproteína.

La presente invención adicionalmente suministra composiciones inmunogénicas, que comprenden un polipéptido de *Staphylococcus epidermidis*, en donde el polipéptido es codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótido que tiene al menos aproximadamente 95% de identidad con una secuencia de nucleótido que se escoge a partir de la SEQ ID NO: 33 a la SEQ ID NO: 64 o una variante degenerada de esta, o un fragmento de esta. En una modalidad particular, la secuencia de polinucleótido de *Staphylococcus epidermidis* se selecciona del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, y SEQ ID NO: 62, o una variante degenerada de esta, o un fragmento de esta.

La presente invención suministra una composición inmunogénica, en donde el polinucleótido se deriva a partir de *Staphylococcus epidermidis*. En una modalidad particular, el polinucleótido adicionalmente comprende nucleótidos heterólogos. En otra modalidad, el polinucleótido está en un vector de expresión. En todavía otra modalidad, el vector de expresión es un plásmido de ADN. En una cierta modalidad, el polinucleótido es un polinucleótido recombinante. En otra modalidad, el polinucleótido está operativamente ligado a uno o más elementos reguladores de expresión de gen. En todavía otra modalidad, el

polinucleótido dirige la expresión de un epitopo de neutralización de *Staphylococcus epidermidis*. nnag
131

La invención también suministra una composición inmunogénica que comprende un polipéptido de *Staphylococcus epidermidis* codificado por un polinucleótido, en donde la composición inmunogénica adicionalmente comprende un agente que facilita la transfección. En una modalidad particular, dicho agente que facilita la transfección es bupivacaína.

La presente invención también suministra un método para inducir una respuesta inmune contra el *Staphylococcus epidermidis* que comprende administrar a un mamífero una cantidad inmunogénica de una composición que comprende: un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido que se escoge de una o más de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 32 o un equivalente biológico de esta, o un fragmento de esta, y un portador farmacéuticamente aceptable.

En adición, la presente invención suministra un método para inducir una respuesta inmune contra el *Staphylococcus epidermidis* que comprende administrar a un mamífero una cantidad inmunogénica de una composición que comprende: un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótido que se escoge de una o más de la SEQ ID NO: 33 a la SEQ ID NO: 64, una variante degenerada de esta, o un fragmento de esta y un portador farmacéuticamente aceptable.

En una modalidad, la invención suministra una composición inmunogénica que comprende un polinucleótido que tiene una

secuencia de nucleótido que se escoge a partir de la SEQ ID NO: 33 a la SEQ ID NO: 64, una variante degenerada de esta, o un fragmento de esta y está comprendida en un vector de expresión. En otra modalidad, el polinucleótido se deriva a partir de *Staphylococcus epidermidis*. En todavía otra modalidad el polinucleótido comprende nucleótidos heterólogos.

En una cierta modalidad, la invención suministra un método para la detección y/o la identificación del *Staphylococcus epidermidis* en una muestra biológica que comprende: (a) poner en contacto la muestra con una sonda de oligonucleótido de un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótido que se escoge a partir de la SEQ ID NO: 33 a la SEQ ID NO: 64, o una variante degenerada de esta, o un fragmento de esta, bajo condiciones que permiten hibridización; y (b) detectar la presencia de complejos de hibridización en la muestra, en donde los complejos de hibridización indican la presencia de *Staphylococcus epidermidis* en la muestra.

En otras modalidades, la invención suministra un método para la detección y/o la identificación de anticuerpos con *Staphylococcus epidermidis* en una muestra biológica que comprende: (a) poner en contacto la muestra con un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido que se escoge a partir de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 32 o un equivalente biológico de esta, o un fragmento de esta, bajo condiciones que permiten formación de complejo inmune; y detectar la presencia de complejo

innate en la muestra, en donde complejo inmune indica la presencia de *Streptococcus pneumoniae* en la muestra.

nn248

133

En una modalidad particular, la composición inmunogénica comprende una secuencia de polipéptido de *Staphylococcus epidermidis* que se selecciona del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 30, un equivalente biológico de esta, o un fragmento de esta. En otra modalidad, la composición inmunogénica comprende una secuencia de polinucleótido de *Staphylococcus epidermidis* que se selecciona del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 62, o una variante degenerada de esta, o un fragmento de esta.

En aún otra modalidad, la invención suministra un método para inducir una respuesta inmune contra *Staphylococcus aureus* que comprende administrar a un mamífero una cantidad inmunogénica de una composición que comprende: una secuencia de polipéptido de *Staphylococcus epidermidis* que se selecciona del grupo que consiste de SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 30, un equivalente biológico de esta, o un fragmento de esta.

~~no 449~~ 734

En una modalidad particular, la invención suministra un método para inducir una respuesta inmune contra *Staphylococcus aureus* que comprende administrar a un mamífero una cantidad inmunogénica de una composición que comprende: una secuencia de polinucleótido de *Staphylococcus epidermidis* que se selecciona del grupo que consiste de SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 62, o una variante degenerada de esta, o un fragmento de esta.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 describe perfiles de expresión de proteína de fracciones de pared celular de *S. epidermidis* 0-47 que crecen en TSB (1A y 1C) o 70% de suero de conejo (1B y 1D), que se comparan por electrofóresis de gel 2D. Se separan las proteínas en tiras IPG de pH 4-7 en la primera dimensión seguido por SDS-PAGE en la segunda dimensión, se transfieren a nitrocelulosa y se detectan por cepa fluorescente (1A y 1C). Las proteínas inmunoreactivas se visualizan con suero inmune (1B y 1D) de conejos infectados con *S. epidermidis* 0-47. Se etiquetan marcadores de peso molecular a la izquierda.

La figura 2 describe teñido fluorescente blot (2A) e immunoblot (2B) de una fracción de superficie celular de *S. epidermidis* 0-47 que crece en 70% de suero de conejo separado en tiras IPG de pH 4-7 en la primer dimensión y SDS-PAGE en la

.. 00249
135

segunda dimensión. Las proteínas en las manchas se identifican por análisis de espectrometría de masa.

La figura 3 describe proteínas, que se eluyen de la superficie de *S. epidermidis* 0-47 que crece en TSB o 70% de suero de conejo con concentraciones incrementadas de NaCl o 4.0 M de urea. Los asteriscos indican proteínas enriquecidas eluidas de la superficie de *S. Epi* que crecen en la presencia de suero. Las bacterias se lavan 3X con TBS luego secuencialmente con 0.5 M y 1.0 M de NaCl y 4.0 M de urea. Las concentraciones de proteína se determinan para cada una de las muestras y 0.75 µg se corre en 4-20% de gel gradiente. No se detecta proteína mediante el ensayo de proteína en las muestras eluidas a partir de la superficie de bacterias que crecen en TSB (líneas 2-5), de tal forma que 25 µl se cargan en el gel. La línea 1, suero de conejo; Líneas 2 y 6 - 0.15 M de NaCl eluado; Líneas 3 y 7 - 0.5 M de NaCl, Líneas 4 y 8 - 1.0 M de NaCl; la línea 5 y 9 - 4.0 M urea.

La figura 4 describe unas proteínas de superficie celular de transferencia 2D de *S. epidermidis*, que se tiñe fluorescentemente para proteína (4A) y se sondea con proteínas de suero biotinilado (4B) eluidas de *S. epidermidis* que crecen en 70% de suero de conejo. Las manchas se visualizan con un conjugado de fosfatasa de estreptavidin-alkalina. Las proteínas en las manchas se identifican por espectroscopia de masa.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

. * 00941
136

Luego de la exposición del torrente sanguíneo del huésped, las bacterias que invaden encuentran un ambiente indicador específico para el nuevo ambiente. Estos indicadores son detectados por las bacterias y los cambios adaptativos de señal en la expresión de proteína que pueden ser detectables en proteínas purificadas de pared celular. A menudo, las proteínas y carbohidratos en las paredes celulares bacteriales son candidatos para la inclusión de composiciones inmunogénicas para tratar o prevenir infecciones bacterianas. Si una proteína regulada positivamente interactúa con el huésped o juega un papel en la adquisición de nutriente, es importante para la bacteria y juega por lo tanto un papel en la supervivencia de la bacteria y la patogénesis. El crecimiento de la bacteria en fluidos corporales (es decir suero, fluidos de dialisato peritoneal, y orina), se ha utilizado como un sistema de modelo para imitar algunas de las señales de bacteria encontradas dentro del huésped. Ver Wiltshire, M.D. and S.J. Foster, Infect Immun, 69(8): p. 5198-202 (2001); Shepard, B.D. and M.S. Gilmore, Infect Immun, 70(8): p. 4344-52 (2002); Smith, D.G., et al., Infect Immun, 59(2): p. 617-24 (1991); McDermid, K.P., et al., Infect Immun, 61(5): p. 1743-9 (1993). Una o más de estas condiciones de cultivo se encuentra que alteran la expresión del gen en *Enterococcus faecalis*, *S. aureus* y *Staphylococcus epidermidis* y aquellas proteínas identificadas por ser incrementadas en la expresión en las condiciones de cultivo alterado se encuentra que pertenece a diferentes clases de proteínas que tienen una variedad de

funciones. Ver Wiltshire, M.D. and S.J. Foster, Infect Immun, 69(8): p. 5198-202 (2001); Shepard, B.D. and M.S. Gilmore, Infect Immun, 70(8): p. 4344-52 (2002).

El factor de predisposición más común para una infección por *Staphylococcus epidermidis* es la implantación de un dispositivo protésico. Un dispositivo protésico implantado llega a ser recubierto con plasma y las proteínas de matriz incluyen fibrinógeno, vitronectina, factor von Willebrand y fibronectina. Ver von Eiff, C., et al., Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 18(12): p. 843-6 (1999). Estas proteínas a menudo actúan como ligandos para proteínas de superficie de *Staphylococcal epidermidis*, permitiendo así a la bacteria unirse y colonizar el dispositivo protésico. El *Staphylococcus epidermidis* es conocido por expresar proteínas que se unen al fibrinógeno, vitronectina y fibronectina. Ver Nilsson, M., et al., A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis*. Infect Immun, 66(6), p. 2666-73 (1998); Davis, S.L., et al., J Biol Chem, 276(30), p. 27799-805 (2001); Williams, R.J., et al., Infect Immun, 70(12), p. 6805-10 (2002); Heilmann, C., et al., Mol Microbiol, 24(5), p. 1013-24 (1997). Es razonable esperar que el *Staphylococcus epidermidis* se una adicionalmente a proteínas de suero en la elaboración de transición de comensal a patógeno.

La invención descrita aquí está dirigida a la necesidad de composiciones inmunogénicas para *Staphylococcus epidermidis* que eviten efectivamente o traten en su mayoría o toda la enfermedad originada por serotipos de *Staphylococcus epidermidis*. La

invención se dirige adicionalmente a la necesidad para métodos de diagnóstico de infección por infección por *Staphylococcus epidermidis*. La presente invención ha identificado cuadros de lectura abiertos para *Staphylococcus epidermidis* aquí en adelante ORF, que codifican polipéptidos antigénicos. Más particularmente, los polipéptidos que codifican el ORF *Staphylococcus epidermidis* sirven como polipéptidos antigénicos potenciales en composiciones inmunogénicas. En ciertas modalidades, la invención comprende ORF polinucleótido *Staphylococcus epidermidis* que codifica la superficie localizada, expuesta, secretada o membrana asociada con antígenos de polipéptido.

En otras modalidades, la invención comprende vectores que comprenden secuencias ORF y células huésped o animales transformadas, transfectadas o infectadas con estos vectores. La invención también comprende productos de gen transcripcional de ORF *Staphylococcus epidermidis*, tal como, por ejemplo, mRNA, ARN antisentido, oligonucleótidos antisentido y moléculas de ribosima, que se pueden utilizar para inhibir o controlar el crecimiento de los microorganismos. La invención también se relaciona con métodos para detectar estos ácidos nucleicos o polipéptidos y kits para diagnosticar infección por *Staphylococcus epidermidis*. La invención también se relaciona con composiciones inmunogénicas para la prevención y/o tratamiento de infección bacteriana, en particular infección originada por o exacerbada por *Staphylococcus epidermidis*. En modalidades particulares la composición inmunogénica se utiliza para el tratamiento o prevención de enfermedades sistémicas, que se

nn243
138

.. non

139

inducen o exacerban por *Staphylococcus epidermidis*. En otras modalidades, las composiciones inmunogénicas se utilizan para el tratamiento o prevención de enfermedades no sistémicas, que se inducen o exacerban por *Staphylococcus epidermidis*.

A. Polipéptidos y polinucleótidos ORF de *Staphylococcus epidermidis*

Polinucleótidos ORF de *Staphylococcus epidermidis* purificados y aislados se identifican los cuales se utilizan en la producción de polipéptidos de *Staphylococcus epidermidis* para la inclusión en composiciones inmunogénicas. Más específicamente, en ciertas modalidades, el ORF codifica la superficie del *Staphylococcus epidermidis* localizada, expuesta, la membrana asociada o polipéptidos secretados, particularmente polipéptidos antigénicos. Así, en un aspecto, la presente invención identifica polinucleótidos purificados y aislados (ORF) que codifican la superficie del *Staphylococcus epidermidis* localizada, expuesta, la membrana asociada o polipéptidos secretados para inclusión en composiciones inmunogénicas. En modalidades particulares, un polinucleótido de la presente invención es una molécula de ADN, en donde el ADN puede ser ADN genómico, ADN cromosomal, ADN plásmido o cADN. En otra modalidad, un polinucleótido es un polinucleótido recombinante, que codifica un polipéptido de *Staphylococcus epidermidis* que comprende una secuencia de aminoácido que tiene al menos 95% de identidad con una secuencia de aminoácido de una de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 32 o un fragmento de esta. En otra modalidad, un polinucleótido ORF

nn725 140

aislado y purificado comprende una secuencia de nucleótido que tiene al menos 95% de identidad con una de las secuencias de nucleótido ORF de la SEQ ID NO: 33 a la SEQ ID NO: 64, una variante degenerada de esta, o un complemento de esta. En una modalidad, un polinucleótido ORF de una de la SEQ ID NO: 33 a la SEQ ID NO: 64 está comprendido en un vector de plásmido y expresado en una célula huésped procariótica.

Como se utiliza aquí, el término "polinucleótido" significa una secuencia de nucleótidos conectada por enlaces de fosfodiéster. Los polinucleótidos se presentan aquí en adelante en la dirección de 5' a 3'. Un polinucleótido de la presente invención puede comprender de aproximadamente 10 a aproximadamente varios cientos de moles de pares base. En una modalidad, un polinucleótido comprende de aproximadamente 10 a aproximadamente 3,000 pares base. Longitudes de ejemplo de polinucleótidos particulares se establecen aquí adelante.

Un polinucleótido como se describe aquí puede ser una molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN), una molécula de ácido ribonucleico (ARN), o análogos de ADN o ARN generados utilizando análogos de nucleótido. La molécula de ácido nucleico puede ser de hélice sencilla o doble hélice, pero preferiblemente es ADN de doble hélice. Cuando un polinucleótido es una molécula de ADN, esta molécula puede ser un gen, una molécula de cADN o una molécula de ADN genómico. Las bases de nucleótido se indican de aquí en adelante mediante una letra código única: adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C), inosina (I) y uracilo (U).

.. nna-5
141

"Aislado" significa alterado "alterado por la mano del hombre" del estado natural. Si una composición o sustancia ocurre en la naturaleza, con el fin de ser considerada "aislada" esta debería haber sido cambiada o removida de su ambiente original, o ambos. Por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido naturalmente presente en un animal viviente no es "aislado," pero el mismo polinucleótido o polipéptido separado de los materiales coexistentes de su estado natural es "aislado," como se emplea el término de aquí en adelante.

Como se utiliza aquí, un polinucleótido "aislado" está libre de secuencias que flanquean naturalmente el ácido nucleico (es decir secuencias ubicadas en los extremos 5' y 3' de ácido nucleico) en el ADN genómico de un organismo para el que el ácido nucleico se deriva. Por ejemplo, en varias modalidades, la molécula de ácido nucleico de *Staphylococcus epidermidis* aislada puede contener menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0.5 kb o 0.1 kb de secuencias de nucleótido que flanquean naturalmente la molécula de ácido nucleico en el ADN genómico de la célula de la que el ácido nucleico se deriva. Sin embargo, la molécula de ácido nucleico del *Staphylococcus epidermidis* se puede fusionar a otra proteína que codifica o secuencias reguladoras y aún ser considerada aislada.

Los polinucleótidos ORF y los polipéptidos así descritos aquí se pueden obtener utilizando técnicas de selección y clonación estándar de una librería de cADN derivada de mRNA. Los

polinucleótidos de la invención también se pueden obtener a partir de fuentes naturales tales como librerías de ADN genómico (por ejemplo, una librería de *Staphylococcus epidermidis*) o se puede sintetizar utilizando técnicas comercialmente disponibles y bien conocidas.

También se abarcan aquí moléculas de ácido nucleico que difieren de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 33 a la SEQ ID NO: 64 (y fragmentos de estas) debido a la degeneración del código genético y así la codificación del mismo polipéptido *Staphylococcus epidermidis* como aquel codificado por la secuencia de nucleótido mostrada en la SEQ ID NO: 33 a la SEQ ID NO: 64.

Variantes alélicas y ortólogas de los polinucleótidos *Staphylococcus epidermidis* se pueden identificar fácilmente utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Las variantes alélicas y ortólogas de los polinucleótidos comprenderán una secuencia de nucleótido que es típicamente al menos aproximadamente 70-75%, más típicamente al menos aproximadamente 80-85%, y más típicamente al menos aproximadamente 90-95% o más homólogas a la secuencia de nucleótido mostrada en la SEQ ID NO: 33 a la SEQ ID NO: 64, o un fragmento de estas secuencias de nucleótido. Tales moléculas de ácido nucleico se pueden identificar fácilmente por ser capaces de hibridizar bajo condiciones estrictas, a la secuencia de nucleótido mostrada en la SEQ ID NO: 33 a la SEQ ID NO: 64, o un fragmento de estas secuencias de nucleótido.

.. n0248143

Más aún, los polinucleótidos pueden comprender solo un fragmento de la región de codificación de un polinucleótido *Staphylococcus epidermidis* o gen, tal como un fragmento de una de la SEQ ID NO: 33 a la SEQ ID NO: 64. En ciertas modalidades, tales fragmentos codifican fragmentos inmunogénicos.

Cuando estos polinucleótidos ORF de *Staphylococcus epidermidis* de la invención se utilizan para la producción recombinante de polipéptidos *Staphylococcus epidermidis* para inclusión en composiciones inmunogénicas, el polinucleótido puede incluir la secuencia de codificación para el polipéptido maduro, por sí mismo, o la secuencia de codificación para el polipéptido maduro en el cuadro de lectura con otras secuencias de codificación, tales como aquellas que codifican un líder o secuencia secretora, una secuencia pre-, o pro- o prepro-proteína, u otras porciones de péptido de fusión. Por ejemplo, una secuencia de marcador que facilita la purificación del polipéptido fusionado que se puede ligar a la secuencia de codificación (ver Gentz et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:821-824, 1989, incorporada como referencia aquí en su totalidad). Así, se contempla aquí la preparación de polipéptidos de fusión de codificación de polinucleótidos que permiten la purificación His-tag de productos de expresión. El polinucleótido también puede contener secuencias de no codificación 5' y 3', tal como secuencias transcritas, no traducidas, señales de poliadenilación y empalme.

Así, un polinucleótido que codifica un polipéptido para la inclusión en composiciones inmunogénicas de la presente invención, que incluye homólogos y ortólogos de las especies diferentes a *Staphylococcus epidermidis*, tal como *Staphylococcus aureus* se puede obtener mediante un proceso que comprende las etapas de seleccionar una librería apropiada bajo condiciones de hibridización estrictas con una sonda etiquetada que tiene la secuencia de una de la SEQ ID NO:33 a la SEQ ID NO:64, un fragmento de estos; y aislar clones genómicos y cADN de longitud completa que contiene la secuencia de polinucleótido. Tales técnicas de hibridización son bien conocidas por el experto en la técnica. El experto en la técnica apreciará que, en muchos casos, una secuencia de cADN aislada será incompleta, en la región de codificación para el polipéptido que es corta en el extremo 5' del cADN. Esta es una consecuencia de la transcriptasa, inversa, una enzima inherentemente de baja "procesabilidad" (una medida de la capacidad de la enzima para permanecer unida a la plantilla durante la reacción de la polimerización), que falla en completar una copia de ADN de la plantilla de mRNA durante la primera síntesis de hélice de cADN.

Así, en ciertas modalidades, la información de secuencia de polinucleótido suministrada aquí permite la preparación de de secuencia de oligonucleótido de ADN relativamente corto (o ARN) que tienen la capacidad de hibridizar específicamente a las secuencias de gen de los polinucleótidos seleccionados descritos aquí adelante. El término "oligonucleótido" como se utiliza aquí se define como una molécula que comprende dos o más

... 00000
145

desoxiribonucleótidos o ribonucleótidos, usualmente más de tres (3), y típicamente más de diez (10) y hasta cien (100) o más (aunque preferiblemente entre veinte y treinta). El tamaño exacto dependerá de muchos factores, que en cambio dependen de la última función o uso del oligonucleótido. Así, en modalidades particulares, la sonda de ácido nucleico de unas longitud apropiada se prepara basado en una consideración de una secuencia de nucleótidos seleccionada, por ejemplo, una secuencia tal como aquella mostrada en la SEQ ID NO:33 a la SEQ ID NO:64. La capacidad de tal sonda de ácido nucleico para hibridizar específicamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido *Staphylococcus epidermidis* les presta particular utilidad en una variedad de modalidades. Más importantemente, las sondas se pueden utilizar en una variedad de ensayos para detectar la presencia de secuencias complementarias en una muestra dada.

En ciertas modalidades, es ventajoso utilizar iniciadores de oligonucleótido. Estos iniciadores se pueden generar en cualquier forma, que incluyen síntesis química, replicación de ADN, transcripción inversa, o una combinación de estos. La secuencia de tales iniciadores se designa utilizando un polinucleótido descrito aquí para uso en la detección, amplificación o mutación de un segmento definido de un polinucleótido ORF que codifica un polipéptido de *Staphylococcus epidermidis* de células procarióticas utilizando tecnología de reacción de cadena de polimerasa (PCR).

nn951
146

En ciertas modalidades, es ventajoso emplear un polinucleótido descrito aquí en combinación con una etiqueta apropiada para detectar la formación híbrida. Una amplia variedad de etiquetas apropiadas se conocen en la técnica, que incluyen ligandos radiactivos, enzimáticos u otros, tal como avidina/biotina, que son capaces de dar una señal detectable.

Polinucleótidos que son idénticos o suficientemente idénticos a una secuencia de nucleótido contenida en una de la SEQ ID NO:33 a la SEQ ID NO:64, o un fragmento de este, se pueden utilizar como sondas de hibridización para cADN y ADN genómico o como iniciadores para una reacción de amplificación de ácido nucleico (PCR), para aislar clones genómicos y de cADN de longitud completa que codifican polipéptidos descritos aquí y para aislar el cADN los clones genómicos de otros genes (que incluyen genes que codifican homólogos y ortólogos de especies diferentes de *Staphylococcus epidermidis*) que tienen una alta similitud de secuencia a las secuencias de polinucleótido establecidas en la SEQ ID NO:33 a la SEQ ID NO:64, o un fragmento de estos. Típicamente estas secuencias de nucleótidos son de al menos aproximadamente 70% idénticos a al menos aproximadamente 95% idénticos a aquel de la secuencia de polinucleótido de referencia. Las sondas o iniciadores generalmente comprenderán al menos 15 nucleótidos, preferiblemente, al menos 30 nucleótidos y pueden tener al menos 50 nucleótidos. Sondas particularmente preferidas tendrán entre 30 y 50 nucleótidos.

nn252
147

Existen varios métodos disponibles y bien conocidos por aquellos expertos en las técnica para obtener cADN de longitud completa, o cADN extendido corto, por ejemplo aquellos basados en el método de Amplificación Rápida de extremos de cADN (RACE). Ver Frohman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8998-9002, 1988. Modificaciones recientes de la técnica, ejemplificada por la tecnología Marathon™ (Clontech Laboratories Inc.) por ejemplo, han simplificado significativamente la búsqueda para cADN mayores. En la tecnología Marathon™, el cADN se ha preparado a partir de mRNA extraído de un tejido escogido y una secuencia "adaptadora" ligada en cada extremo. La amplificación de ácido nucleico (PCR) luego se lleva a cabo para amplificar el extremo 5' "desaparecido" del cADN utilizando una combinación de iniciadores de oligonucleótido de adaptador específico y de gen específico. Las reacciones PCR luego se repiten utilizando iniciadores "anidados", que es, iniciadores designados para endurecimiento dentro del producto amplificado (típicamente un iniciador adaptador específico que endurece adicionalmente 3' en la secuencia adaptadora y un iniciador específico de gen que endurece adicionalmente 5' en la secuencia de gen conocida). Los productos de esta reacción luego se pueden analizar por secuenciamiento de ADN y cADN de longitud completa construido al unir el producto directamente al cADN existente para dar una secuencia completa, o llevar a cabo un PCR de longitud completa separado utilizando la nueva información de secuencia para el diseño del iniciador 5'.

nn25g
148

Para suministrar ciertas de las ventajas de acuerdo con la presente invención, una secuencia de ácido nucleico preferido empleada para estudios de hibridización o ensayos incluyen moléculas de sonda que son complementarias a al menos unos 10 a aproximadamente 70 nucleótidos de tramo largo de un polinucleótido que codifica un polipéptido *Staphylococcus epidermidis*, tal como aquel que se muestra en una de la SEQ ID NO:33 a la SEQ ID NO:64. Un tamaño de al menos 10 nucleótidos de longitud ayuda a asegurar que el fragmento será de suficiente longitud para formar una molécula dúplex que es estable y selectiva. Moléculas que tienen secuencias complementarias sobre tramos mayores de 10 bases de longitud se prefieren generalmente aunque, con el fin de incrementar la estabilidad y selectividad del híbrido, y por lo tanto mejorar la calidad y el grado de moléculas híbridas específicas obtenidas. Uno preferirá generalmente diseñar moléculas de ácido nucleico que tienen tramo complementario de gen de 25 a 40 nucleótidos, 55 a 70 nucleótidos, o un mayor donde se desee. Tales fragmentos se pueden preparar fácilmente, por ejemplo, al sintetizar directamente el fragmento por medios químicos, por aplicación de tecnología de reproducción de ácido nucleico, tal como tecnología PCR de (Patente Estadounidense 4,683,202, incorporada aquí como referencia) o al escindir fragmentos de ADN seleccionados de plásmidos recombinantes que contienen insertos apropiados y sitios de restricción de enzima adecuados.

En otra modalidad, se contempla que un polinucleótido aislado y purificado comprende una secuencia de nucleótido que es

idéntica o complementaria a un segmento de al menos 10 bases continuas de la SEQ ID NO:33 a la SEQ ID NO:64, en donde el polinucleótido hibridiza a un polinucleótido que codifica un polipéptido *Staphylococcus epidermidis*. Preferiblemente, el polinucleótido purificado y aislado comprende una secuencia base que es idéntica o complementaria con un segmento de al menos 25 a aproximadamente 70 bases continuas de la SEQ ID NO:33 a la SEQ ID NO:64. Por ejemplo, el polinucleótido puede comprender unos segmentos de bases idénticas o complementarias a 40 o 55 bases continuas de las secuencias de nucleótidos descritas.

De acuerdo con esto, una molécula de sonda de polinucleótido se puede utilizar por su capacidad para formar selectivamente moléculas dúplex con tramo complementario del gen. Dependiendo de la solicitud propuesta, uno desearía emplear condiciones variantes de hibridización para lograr un grado de variación de selectividad de la sonda hacia la secuencia objetivo (ver Tabla 1 adelante). Para aplicaciones que requieren alto grado de selectividad, uno desearía típicamente emplear condiciones relativamente estrictas para formar los híbridos. Para algunas aplicaciones, por ejemplo, cuando uno desea preparar mutantes que emplean una hélice iniciadora mutante hibridizada para una plantilla destacada o en donde uno busca aislar una secuencia de codificación de polipéptido homologa de *Staphylococcus epidermidis* de otras células, equivalente funcionales, o similares, menos condiciones de hibridización estrictas son típicamente necesarias para permitir la formación del heterodúplex (ver Tabla 1). Las especies de hibridización cruzada

nn254
1A9

pueden por lo tanto ser fácilmente identificadas como señales de hibridización positivamente con respecto a hibridizaciones de control. Así, las condiciones de hibridización son fácilmente manipuladas, y así serán generalmente un método de elección dependiendo de los resultados deseados.

Para algunas aplicaciones, por ejemplo, cuando uno desea preparar mutantes que emplean una hélice de iniciador mutante hibridizada para una plantilla destacada o cuando uno busca aislar una secuencia de codificación de polipéptido homologa de otras células, equivalentes funcionales, o similares, menos condiciones de hibridización estrictas son típicamente necesarias para permitir la formación del heterodúplex. Las especies de hibridización cruzadas son por lo tanto fácilmente de identificadas como señales de hibridización positivas con respecto a hibridizaciones de control. En cualquier caso, se aprecia generalmente que las condiciones se pueden presentar más estrictas por la adición de cantidades incrementadas de formamida, que sirven para desestabilizar el dúplex híbrido en la misma forma como se incrementa la temperatura. Así, las condiciones de hibridización se manipulan fácilmente, y así serán generalmente un método de elección dependiendo de los resultados deseados.

También se describen aquí polinucleótidos capaces de hibridizar bajo condiciones estrictas reducidas, más preferiblemente condiciones estrictas, y más preferiblemente

nn255
150

... n0258
151

condiciones altamente estrictas, para polinucleótidos descritos aquí en adelante.

Ejemplos de condiciones estrictas se muestran en la Tabla 1 adelante: condiciones altamente estrictas son aquellas que son al menos tan estrictas como, por ejemplo, condiciones A-F; condiciones estrictas son al menos tan estrictas como, por ejemplo, condiciones G-L; y condiciones estrictas reducidas son al menos tan estrictas como, por ejemplo, condiciones M-R.

Tabla 1

Condiciones Estrictas

Condición Estricta	Híbrido de Polinucleótido	Longitud del Híbrido (bp) ^I	Temperatura de Hibridización y Amortiguador ^H	Temperatura de Lavado y Amortiguador ^H
A	ADN:ADN	> 50	65°C; 1xSSC - o- 42°C; 1xSSC, 50% formamida	65°C; 0.3xSSC
B	ADN:ADN	< 50	T _B ; 1xssc	T _B ; 1xSSC
C	ADN:ARN	> 50	67°C; 1xSSC - o- 45°C; 1xSSC, 50% formamida	67°C; 0.3xSSC
D	ADN:ARN	< 50	T _D ; 1xSSC	T _D ; 1xSSC
E	ARN:ARN	> 50	70°C; 1xSSC - o- 50°C; 1xSSC, 50% formamida	70°C; 0.3xSSC
F	ARN:ARN	< 50	T _F ; 1xSSC	T _F ; 1xSSC

G	ADN:ADN	> 50	65°C; 4xSSC - o- 42°C; 4xSSC, 50% formamida	65°C; 1xSSC
H	ADN:ADN	< 50	T _H ; 4xSSC	T _H ; 4xSSC
I	ADN:ARN	> 50	67°C; 4xSSC - o- 45°C; 4xSSC, 50% formamida	67°C; 1xSSC
J	ADN:ARN	< 50	T _J ; 4xSSC	T _J ; 4xSSC
K	ARN:ARN	> 50	70°C; 4xSSC - o- 50°C; 4xSSC, 50% formamida	67°C; 1xSSC
L	ARN:ARN	< 50	T _L ; 2xSSC	T _L ; 2xSSC
M	ADN:ADN	> 50	50°C; 4xSSC - o- 40°C; 6xSSC, 50% formamida	50°C; 2xSSC
N	ADN:ADN	< 50	T _N ; 6xSSC	T _N ; 6xSSC
O	ADN:ARN	> 50	55°C; 4xSSC - o- 42°C; 6xSSC, 50% formamida	55°C; 2xSSC
P	ADN:ARN	< 50	T _P ; 6xSSC	T _P ; 6xSSC
Q	ARN:ARN	> 50	60°C; 4xSSC - o- 45°C; 6xSSC, 50% formamida	60°C; 2xSSC
R	ARN:ARN	< 50	T _R ; 4xSSC	T _R ; 4xSSC

(bp)¹: la longitud híbrida es aquella anticipada por las regiones hibridizadas de los polinucleótidos de hibridización. Cuando se hibridiza un polinucleótido con un polinucleótido objetivo de una secuencia desconocida, la longitud del híbrido se asume por ser aquella del polinucleótido de hibridización. Cuando los polinucleótidos de las secuencias conocidas se hibridizan, la longitud del híbrido se puede determinar al alinear las secuencias de los polinucleótidos e identificar la región o regiones de complementariedad de secuencia óptima.

Amortiguador^H: SSPE (1xSSPE es 0.15M de NaCl, 10mM de NaH₂PO₄, y 1.25mM EDTA, pH 7.4) se pueden sustituir para SSC (1xSSC es 0.15M de NaCl y 15mM de citrato de sodio) en la hibridización y amortiguadores de lavado; los lavados se desarrollan durante 15 minutos después de que se completa la hibridización.

T_B a T_R: la temperatura de hibridización para híbridos anticipados por ser menor de 50 pares base de longitud debe ser 5-10°C menos que la temperatura de fusión (T_m) del híbrido, en donde T_m se determina de acuerdo con las siguientes ecuaciones. Para híbridos menos de 18 pares base de longitud, T_m(°C) = 2(# de A + T bases) + 4(# de G + C bases). Para los híbridos entre 18 y 49 pares base de longitud, T_m(°C) = 81.5 + 16.6(log₁₀[Na⁺]) + 0.41(%G+C) - (600/N), en donde N es el número de bases en el híbrido, y [Na⁺] es la concentración de iones de sodio en el amortiguador de hibridización ([Na⁺] para 1xSSC = 0.165 M).

Ejemplos adicionales de condiciones estrictas para hibridización de polinucleótidos se suministra en Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, capítulos 9 y 11, y Ausubel et al., 1995, Current Protocols in Molecular Biology, eds., John Wiley & Sons, Inc., secciones 2.10 y 6.3-6.4, incorporadas aquí como referencia.

B. Polipéptidos de *Staphylococcus epidermidis*

En modalidades particulares, la presente invención suministra polipéptidos *Staphylococcus epidermidis* asilados y purificados para el uso en composiciones inmunogénicas. Preferiblemente, un polipéptido *Staphylococcus epidermidis* utilizado en una composición inmunogénica de la invención es un polipéptido recombinante. En ciertas modalidades, un polipéptido *Staphylococcus epidermidis* comprende la secuencia de aminoácido que tiene al menos 95% de identidad a la secuencia de aminoácido

de una de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 32, un equivalente biológico de este, o un fragmento de este.

nn 253
154

Un polipéptido de *Staphylococcus epidermidis* utilizado en una composición inmunogénica de la presente invención abarca un polipéptido que comprende: 1) la secuencia de aminoácido mostrada en una de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 32; 2) variantes de ocurrencia natural funcional y no funcional o equivalente biológicos de polipéptidos *Staphylococcus epidermidis* de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 32; 3) variantes producidas recombinantemente o equivalentes biológicos de polipéptidos *Staphylococcus epidermidis* de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 32; y 4) polipéptidos aislados de organismos diferentes de *Staphylococcus epidermidis* (ortólogos de polipéptidos de *Staphylococcus epidermidis*).

Un equivalente biológico o variante de tal un polipéptido de *Staphylococcus epidermidis* abarca 1) un polipéptido aislado de *Staphylococcus epidermidis*; y 2) un polipéptido que contiene sustancialmente homología para un polipéptido de *Staphylococcus epidermidis*.

Equivalentes biológicos o variantes de *Staphylococcus epidermidis* incluyen polipéptidos funcionales y no funcionales de *Staphylococcus epidermidis*. Equivalentes biológicos funcionales o variantes son variantes de aminoácido de ocurrencia natural de un polipéptido *Staphylococcus epidermidis* que mantiene la capacidad para elicitar una respuesta inmunológica o antigénica en un

... 110-10
155

sujeto. Variantes funcionales contendrán típicamente solo sustituciones conservadoras de uno o más aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 32, o sustitución, eliminación o inserción de residuos no críticos en regiones no críticas del polipéptido (por ejemplo, no en regiones que contienen determinantes antigénicos o epitopos protectores).

La presente invención suministra adicionalmente ortólogos no *Staphylococcus epidermidis* de polipéptidos *Staphylococcus epidermidis*. Ortólogos de polipéptidos *Staphylococcus epidermidis* son polipéptidos que se aíslan de organismos no *Staphylococcus epidermidis* y poseen capacidad antigénica del polipéptido *Staphylococcus epidermidis*. Ortólogos de un polipéptido de *Staphylococcus epidermidis* puede ser fácilmente identificado ya que comprende una secuencia de aminoácido que es sustancialmente homologa a una de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 32.

Se pueden hacer cambios y modificaciones en la estructura de un polipéptido de la presente invención y obtener todavía una molécula que tiene antigenicidad para *Staphylococcus epidermidis*. Por ejemplo, ciertos aminoácidos se pueden sustituir por otros aminoácidos en una secuencia sin pérdida apreciable de antigenicidad. Debido a la capacidad y naturaleza interactiva de un polipéptido que define que la actividad funcional biológica del polipéptido, ciertas distribuciones de secuencia de aminoácidos se pueden hacer en una secuencia de polipéptido (o, por supuesto, su secuencia de codificación de ADN destacada) y no obstante obtener un polipéptido con propiedades similares.

. nna
156

En la elaboración de tales cambios, el índice hidropático de los aminoácidos se puede considerar. La importancia del índice de aminoácido hidropático en conferir una función biológica interactiva en un polipéptido se entiende generalmente en la técnica (Kyte and Doolittle, J Mol Biol, 157: p. 105-132, 1982). Se conoce que ciertos aminoácidos se pueden sustituir por otros aminoácidos que tienen un índice hidropático similar o clasificación y aún resultar en un polipéptido con similar actividad biológica. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático sobre la base de su hidrofobicidad y características de carga. Aquellos índices son: isoleucina (+4.5); valina (+4.2); leucina (+3.8); fenilalanina (+2.8); cisteína/cistina (+2.5); metionina (+1.9); alanina (+1.8); glicina (-0.4); treonina (-0.7); serina (-0.8); triptofan (-0.9); tirosina (-1.3); prolina (-1.6); histidina (-3.2); glutamato (-3.5); glutamina (-3.5); aspartato (-3.5); asparagina (-3.5); lisina (-3.9); y arginina (-4.5).

Se cree que el carácter hidropático relativo del residuo de aminoácido determina la estructura secundaria y terciaria del polipéptido resultante, que en cambio define la interacción del polipéptido con otras moléculas, tal como enzimas, sustratos, receptores, anticuerpos, antígenos, y similares. Se conoce en la técnica que un aminoácido se puede sustituir por otro aminoácido que tiene un índice hidropático similar y obtiene todavía un polipéptido funcionalmente equivalente. En tales cambios, la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están

dentro de ± 2 se prefiere, aquellos que están dentro de ± 1 son particularmente preferidos, y aquellos dentro de ± 0.5 son aún más particularmente preferidos. non 2
157

También se pueden hacer sustituciones similares de aminoácidos sobre la base de la hidrofiliicidad, particularmente cuando el polipéptido equivalente funcional biológico o polipéptido así creado esta destinado para uso en modalidades inmunológicas. La Patente Estadounidense 4,554,101, incorporada aquí como referencia, establece que la hidrofiliicidad promedio mayor de un polipéptido, regido por la hidrofiliicidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenicidad y antigenicidad, es decir con una propiedad biológica del polipéptido.

Como se detalla en la Patente Estadounidense 4,554,101, los siguientes valores de hidrofiliicidad se han asignado a residuos de aminoácidos: arginina (+3.0); lisina (+3.0); aspartato (+3.0 ± 1); glutamato (+3.0 ± 1); serina (+0.3); asparagina (+0.2); glutamina (+0.2); glicina (0); prolina (-0.5 ± 1); treonina (-0.4); alanina (-0.5); histidina (-0.5); cisteína (-1.0); metionina (-1.3); valina (-1.5); leucina (-1.8); isoleucina (-1.8); tirosina (-2.3); fenilalanina (-2.5); triptofan (-3.4). Se entiende que un aminoácido se puede sustituir por otro que tiene un valor similar de hidrofiliicidad y obtener todavía un equivalente biológico, y en particular, un polipéptido inmunológicamente equivalente. En tales cambios, la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofiliicidad están dentro de ± 2

nn2c3
158

se prefieren, aquellos que están dentro de ± 1 son particularmente preferidos, y aquellos dentro de ± 0.5 son aún más particularmente preferidos.

Como se destaco anteriormente, las sustituciones de aminoácidos se basan por lo tanto generalmente en la similitud relativa de los sustituyentes de aminoácidos cadena lateral, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliicidad, carga, tamaño, y similares. Sustituciones de ejemplo que toman varias de las anteriores características en consideración don bien conocidos por aquellos expertos en la técnica e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina (Ver Tabla 2, adelante). La presente invención contempla así composiciones inmunogénicas que comprenden equivalente biológicos o funcionales de un polipéptido *Staphylococcus epidermidis* como se establece adelante.

Tabla 2

Sustituciones de Aminoácido

Residuo Original	Sustitución de Residuo de Ejemplo
Ala	Gly; Ser
Arg	Lys
Asn	Gln; His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp

.. 00244
159

Gly	Ala
His	Asn; Gln
Ile	Leu; Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg
Met	Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

Equivalentes biológicos o funcionales de un polipéptido también se pueden preparar utilizando mutagénesis específica del sitio. La mutagénesis específica del sitio es una técnica útil en la preparación de polipéptidos de segunda generación, o péptidos o polipéptidos biológicamente funcionales equivalentes, derivados de las secuencias de estos, a través de mutagénesis específica ADN codificante. Como se anoto anteriormente, tales cambios pueden ser deseables en donde se desean sustituciones de aminoácidos. La técnica suministra adicionalmente una capacidad lista para preparar y ensayar variantes de secuencia, por ejemplo, incorporando una o más de las anteriores consideraciones, al introducir uno o más cambios de secuencias de nucleótidos en el ADN. La mutagénesis específica de sitio permite la producción de mutantes a través del uso de secuencias de oligonucleótido específico que codifican la secuencia de ADN de la mutación deseada, así como también un número suficiente de nucleótidos adyacentes, para suministrar una secuencia iniciadora de tamaño suficiente y complejidad de secuencia para formar un dúplex estable en ambos lados de la unión de eliminación que es

. nn205
160

transversa. Típicamente, un iniciador de aproximadamente 17 a 25 nucleótidos de longitud se prefiere, con aproximadamente 5 a 10 residuos en ambos lados de la unión de la secuencia que se altera.

En general, la técnica de mutagénesis específica de sitio es bien conocida en el arte. Como se apreciara, la técnica emplea típicamente un vector fago que puede existir en una forma de hélice sencilla y doble hélice. Típicamente, la mutagénesis dirigida al sitio de acuerdo con esto se desarrolla al obtener primero un vector de doble hélice que incluye dentro de sus secuencia una secuencia de ADN que codifica todo o una porción de la secuencia de polipéptido de *Staphylococcus epidermidis* seleccionada. Un iniciador de oligonucleótido que lleva la secuencia mutada deseada se prepara (por ejemplo, sintéticamente). Este iniciador luego se endurece con el vector de hélice sencilla, y se extiende mediante el uso de enzimas tal como fragmento Klenow I de polimerasa *E. coli*, con el fin de completar la síntesis de la hélice que lleva la mutación. Así, se forma un heterodúplex en donde una hebra codifica la secuencia no mutada original y la segunda hélice lleva la mutación deseada. Este vector heterodúplex se utiliza luego para transformar células apropiadas tal como células *E. coli* y los clones se seleccionan que incluyen vectores recombinantes que llevan la mutación. Kits disponibles comercialmente vienen con todos los reactivos necesarios, excepto los iniciadores de oligonucleótido.

Un antígeno de polipéptido o polipéptido *Staphylococcus epidermidis* utilizado en una composición inmunogénica de la presente invención se entiende que es cualquier polipéptido de *Staphylococcus epidermidis* que comprende similitud sustancial de secuencia, similitud estructural y/o similitud funcional para un polipéptido *Staphylococcus epidermidis* que comprende la secuencia de aminoácido de una de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 32. Adicionalmente, tal un polipéptido de *Staphylococcus epidermidis* o antígeno de polipéptido no se limita a una fuente particular. Así, la invención suministra la detección general y aislamiento de los polipéptidos de una variedad de fuentes.

Se contempla en la presente invención, que un polipéptido de *Staphylococcus epidermidis* puede ventajosamente ser clivado en fragmentos para uso en análisis funcional o estructural adicional, o en la generación de reactivos tal como polipéptidos relacionados con *Staphylococcus epidermidis* y anticuerpos específicos para *Staphylococcus epidermidis*. Esto se puede lograr al tratar polipéptidos de *Staphylococcus epidermidis* purificados o no purificados con un peptidasa tal como endoproteinasa glu-C (Boehringer, Indianapolis, IN). El tratamiento con CNBr es otro método mediante el cual los fragmentos de péptidos se pueden producir de polipéptidos *Staphylococcus epidermidis* naturales. Técnicas recombinantes también se pueden utilizar para producir fragmentos específicos de un polipéptido *Staphylococcus epidermidis*.

162

nncc7

Fragmentos de los polipéptidos *Staphylococcus epidermidis* también se incluyen en las composiciones inmunogénicas de la invención. Un fragmento es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido que es completamente la misma como parte, pero no todo, de la secuencia de aminoácido. El fragmento puede comprender, por ejemplo, al menos 7 o más aminoácidos contiguos (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, o más) de una secuencia de aminoácido de una de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 32. Los fragmentos se pueden "independientes" o comprendidos dentro de un polipéptido mayor del cual ellos forman una parte o región, más preferiblemente como una región única, continua. En una modalidad, los fragmentos incluyen al menos un epitopo de la secuencia de polipéptido madura.

"Proteína de fusión" se refiere a una proteína o polipéptido codificado por dos, a menudo no relacionados, genes fusionados o fragmentos de estos. Por ejemplo, se han descrito las proteínas de fusión o polipéptidos que comprenden varias porciones de moléculas de inmunoglobulina de región constante junto con otra proteína humana o parte de esta. En muchos casos, emplear una región Fc de inmunoglobulina como una parte de una proteína de fusión o polipéptido es ventajoso para el uso en terapia y diagnostico que resulta en, por ejemplo, propiedades farmacocinéticas mejoradas (ver por ejemplo, Solicitud Internacional EP-A 0232 2621). de otra parte, para algunos usos es deseable ser capaz de eliminar la parte Fc después de que el polipéptido o proteína de fusión se ha expresado, detectado y purificado.

163
nnecg

Se contempla que los polipéptidos de *Staphylococcus epidermidis* se pueden aislar de *Staphylococcus epidermidis* o preparar recombinantemente como se describió aquí.

C. VARIANTE DE POLIPÉPTIDO Y POLINUCLEÓTIDO DE *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*

"Variante" como se utiliza el término aquí en adelante, es un polipéptido o polinucleótido que difiere de un polipéptido o polinucleótido de referencia respectivamente, pero retiene propiedades esenciales. Una variante típica de un polinucleótido difiere de una secuencia de nucleótido a otra, referencia de polinucleótido. Los cambios en la secuencia de nucleótido de la variante pueden o no alterar la secuencia de aminoácido de un polipéptido codificado por polinucleótido de referencia. Los cambios de nucleótido pueden resultar en sustituciones de aminoácidos, adiciones, eliminaciones, fusiones y truncaciones en el polipéptido codificado por la secuencia de referencia, como se discute adelante. Una variante típica de un polipéptido difiere en una secuencia de aminoácido de otro, polipéptido de referencia. De forma general, se limita las diferencias de tal forma que las secuencias del polipéptido de referencia y la variante son cercanamente similares y, en muchas regiones, idénticas. Un polipéptido de referencia y variante pueden diferir en la secuencia de aminoácidos por una o más sustituciones, adiciones, eliminaciones en cualquier combinación. Un residuo de aminoácido insertado o sustituido puede o no ser codificado por

464

el código genético. Una variante de un polinucleótido o polipéptido puede ser de ocurrencia natural tal como una variante alélica, o esta puede ser una variante que es conocida por ser de ocurrencia natural. Variantes de ocurrencia no natural de polinucleótidos y polipéptidos se pueden hacer por técnicas de mutagénesis o por síntesis directa.

"Identidad", como se conoce en la técnica, es una relación entre dos o más secuencias de polipéptido o dos o más polinucleótidos, como se determina al comparar las secuencias. En la técnica, "identidad" también significa el grado de relación de secuencia entre las secuencias de polinucleótido o polipéptido, según pueda ser el caso, según se determina por el case entre las hélices de tales secuencias. "Identidad" y "similitud" se pueden calcular fácilmente por métodos conocidos, que incluyen pero no se limitan a aquellos descritos en (Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics y Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; y Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988). Métodos para determinar la identidad se diseñan para dar el case más grande entre las secuencias probadas. Los métodos para determinar la identidad y la similitud se codifican en programas de computador únicamente

165

nn770

disponibles. Los métodos de programa de computador para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan a, el paquete de programa GCG (Devereux et al., *Nucleic Acids Research* 12(1):387, 1984), BLASTP, BLASTN, TBLASTN y FASTA (Altschul et al., *J. Molec. Biol.* 215:403-410, 1990). El programa BLASTX está públicamente disponible de NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul et al., *J. Molec. Biol.* 215:403-410, 1990.). El algoritmo de Smith-Waterman bien conocido también se puede utilizar para determinar la identidad.

Por vía de ejemplo, un secuencia de polinucleótido descrita aquí puede ser idéntica a la secuencia de referencia de una de la SEQ ID NO: 33 a la SEQ ID NO: 64, que es 100% idéntica, o esta puede incluir hasta un cierto número entero de alteraciones de nucleótidos según se compara con la secuencia de referencia. Tales alteraciones se seleccionan del grupo que consiste de al menos una eliminación de nucleótido, substitución, que incluye transición y transversión, o inserción, y en donde dichas alteraciones pueden ocurrir en las posiciones de terminal 5' o 3' de la secuencia de nucleótido de referencia o en cualquier parte entre aquellas posiciones de terminal, entremezclado ya sea individualmente entre los nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. El número de alteraciones de nucleótido se determina al multiplicar el número total de nucleótidos en una de la SEQ ID NO: 33 a la SEQ ID NO: 64 por el porcentaje numérico

766

nn221

, del porcentaje de identidad respectivo (dividido por 100) y restar ese producto de dicho número total de nucleótidos en una de la SEQ ID NO: 33 a la SEQ ID NO: 64.

Por ejemplo, un polinucleótido de *Staphylococcus epidermidis* aislado que comprende una secuencia de nucleótido que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de ácido nucleico de una de la SEQ ID NO: 33 a la SEQ ID NO: 64; una variante degenerada de esta o un fragmento de esta, en donde la secuencia de polinucleótido puede incluir hasta n_n alteraciones de ácido nucleico sobre la región de polinucleótido completa de la secuencia de ácido nucleico de una de la SEQ ID NO: 33 a la SEQ ID NO: 64, en donde n_n es el número máximo de alteraciones y se calcula por la fórmula:

$$n_n \leq x_n - (x_n \cdot y),$$

en la que x_n es el número total de ácido nucleico de una de la SEQ ID NO: 33 a la SEQ ID NO: 64 y tiene un valor de 0.70, en donde cualquier producto entero de x_n y y se redondea al entero más cercano antes de restar tal producto de x_n . Por supuesto, y también puede tener un valor de 0.80 para el 80%, 0.85 para el 85%, 0.90 para el 90%, 0.95 para el 95%, etc. Alteraciones de una secuencia de polinucleótido que codifica uno de los polipéptidos de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 32 pueden crear desplazamiento de cuadro de lectura, mutación sin sentido invertida o mutación sin sentido en esta secuencia de codificación y por lo tanto

alterar el polipéptido codificado por el polinucleótido luego de tales alteraciones.

De forma similar, una secuencia de polipéptido descrita aquí puede ser idéntica a la secuencia de referencia de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 32, que es 100% idéntica, o esta puede incluir hasta un cierto número entero de alteraciones de aminoácido según se compara con la secuencia de referencia tal que el % de identidad es menor del 100%. Tales alteraciones se seleccionan del grupo que consiste de al menos una eliminación de aminoácido, sustitución, que incluye sustitución conservadora y no conservadora, o inserción, y en donde dichas alteraciones pueden ocurrir en las posiciones amino- o carboxi-terminal de la secuencia de polipéptido de referencia o en cualquier parte entre aquellas posiciones terminales, entremezclado ya sea individualmente entre los aminoácidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. El número de alteraciones de aminoácido para un porcentaje de identidad se determina al multiplicar el número total de aminoácidos en una de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 32 por el porcentaje numérico del porcentaje de identidad respectivo (dividido por 100) y luego restar ese producto de dicho número total de aminoácidos en una de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 32, o:

$$n_a \leq x_a - (x_a \cdot y),$$

nn²⁷³

en donde n_a es el número de alteraciones de aminoácido, x_a es el número total de aminoácidos en una de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 32, y y es, por ejemplo 0.70 para el 70%, 0.80 para el 80%, 0.85 para el 85% etc., y en donde cualquier producto no entero de x_a y y se redondea al entero más cercano antes de restarlo de x_a .

D. Vectores, Células Huésped y Polipéptidos *Staphylococcus epidermidis* Recombinante

En una modalidad, la presente invención suministra vectores de expresión que comprenden polinucleótidos ORF que codifican polipéptidos de *Staphylococcus epidermidis* para uso en composiciones inmunogénicas. Los vectores de expresión de *Staphylococcus epidermidis* comprenden polinucleótidos ORF que codifican polipéptidos de *Staphylococcus epidermidis* que comprenden la secuencia de residuo de aminoácido de una de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 32. Alternativamente, los vectores de expresión comprenden un polinucleótido que comprende la secuencia base de nucleótido de una de la SEQ ID NO: 33 a la SEQ ID NO: 64. En otras modalidades, los vectores de expresión de la invención comprenden un polinucleótido ligado operativamente a un promotor-mejorador. En todavía otras modalidades, los vectores de expresión comprenden un polinucleótido ligado operativamente a un promotor procariótico. Alternativamente, los vectores de expresión comprenden un polinucleótido ligado operativamente a un promotor mejorador que es un promotor eucariótico. Los vectores de expresión comprenden adicionalmente una señal de poliadenilación que se posiciona en 3' del aminoácido terminal

nn274
169

carboxi y dentro de una unidad transcripcional del polipéptido codificado.

La expresión de proteínas en procariotes se lleva a cabo más a menudo en *E. coli* con vectores que contienen promotores inducibles o constitutivos que dirigen la expresión de proteínas de fusión o no fusión. Los vectores de fusión agregan un número de aminoácidos a una proteína codificada allí, usualmente al terminar amino de la proteína recombinante. Tales vectores de fusión sirven típicamente para tres propósitos: 1) incrementar la expresión de la proteína recombinante; 2) incrementar la solubilidad de la proteína recombinante; y 3) ayudar en la purificación de la proteína recombinante al actuar como un ligando en la purificación de afinidad. A menudo, en los vectores de expresión de fusión, un sitio de clivaje proteolítico se introduce en la unión de la porción de fusión y la proteína recombinante para permitir la separación de la proteína recombinante de la porción de fusión posterior para purificación de la proteína de fusión. Tales enzimas, y sus secuencias de reconocimiento de cognato, incluyen factor Xa, trombina y enteroquinasa.

Vectores de expresión de fusión típicos incluyen pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith and Johnson, *Gene* 67:31-40, 1988), pMAL (New England Biolabs, Beverly; MA) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) que fusiona la glutational S-transferasa (GST), proteína de unión de maltosa E o proteína A, respectivamente, para la proteína recombinante objetivo.

En una modalidad, la secuencia de codificación del polinucleótido *Staphylococcus epidermidis* se clona en un vector de expresión pGEX para crear un vector que codifica una proteína de fusión que comprende, del N-terminal al C-terminal, clivaje de GST-trombina de polipéptido de sitio-*Staphylococcus epidermidis*. La proteína de fusión se puede purificar mediante cromatografía de afinidad utilizando resina de glutationa-agarosa. Polipéptido recombinante *Staphylococcus epidermidis* no fusionado a GST que puede ser recuperado por clivaje de la proteína de fusión con trombina.

nn
140

Ejemplos de vectores de expresión *E. coli* de no fusión inducibles adecuados incluyen pTrc (Amann et al., Gene 69:301-315, 1988), pET IId (Studier et al. "Gene Expression Technology" Methods in Enzymology 185, 60-89, 1990), pBAD y pCRT7. La expresión del gen objetivo del vector pTrc descansa en la transcripción de polimerasa de ARN huésped de un promotor de fusión trp-lac híbrido. La expresión de gen objetivo del el vector pET IId descansa en la transcripción de un promotor de fusión 0-lac gnl T7 mediado por una polimerasa de ARN viral coexpresada gnl J7. Esta polimerasa viral es suministrada por cepas huésped BL21 (DE3) o HMS I 74(DE3) de un profago residente que hospeda un gen gnl T7 bajo el control transcripcional del promotor lacUV 5.

Una estrategia para maximizar la expresión de proteína recombinante en *E. coli* es expresar la proteína en una bacteria

. 00296
171

huésped con una capacidad dañada para clivar proteolíticamente la proteína recombinante. Otra estrategia es alterar la secuencia de ácido nucleico del ácido nucleico a ser insertado en un vector de expresión de tal forma que los codones individuales para cada aminoácido son aquellos utilizados preferencialmente en *E. coli*. Tal alteración de secuencias de ácido nucleico de la invención se pueden llevar a cabo mediante mutagénesis de ADN estándar o técnicas de síntesis.

En otra modalidad, el vector de expresión del polinucleótido *Staphylococcus epidermidis* es un vector de expresión de levadura. Ejemplos de vectores de expresión en levadura *S. cerevisiae* incluyen pYepSec I (Baldari, et al., Embo J, 6: p. 229-234, 1987), pMFa (Kurjan y Herskowitz, Cell, p. 933-943, 1982), pJRY88 (Schultz et al., Gene, 54: p. 113-123, 1987), y pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA).

Alternativamente, se puede expresar un polinucleótido *Staphylococcus epidermidis* en células de insecto que utilizan, por ejemplo, vectores de expresión de baculovirus. Los vectores de baculovirus disponibles para expresión de proteínas en células de insectos cultivadas (por ejemplo, células Sf 9) incluyen las series pAc (Smith et al., Mol Cell Biol, 3: p. 2156-2165, 1983) y las series pVL (Lucklow and Summers, Virology, 170: p. 31-39, 1989).

En aun otra modalidad, un ácido nucleico de la invención se expresa en células de mamífero que utilizan un vector de

- 00227
772

expresión de mamífero. Ejemplos de vectores de expresión de mamífero incluyen pCDM8 (Seed, Nature, 329: p. 840, 1987) y pMT2PC (Kaufman et al., EMBO J, 6: p. 187-195, 1987). Cuando se utiliza en células de mamíferos, las funciones de control del vector de expresión se suministran a menudo por elementos reguladores virales.

Como se utiliza aquí, un promotor es una región de una molécula de ADN típicamente dentro de aproximadamente 100 nucleótidos pares en frente de (corriente arriba de) el punto en el que inicia la transcripción (es decir, un sitio de inicio de transcripción). Esa región típicamente contiene varios tipos de elementos de secuencia de ADN que se ubican en posiciones relativas similares en diferentes genes. Como se utiliza aquí, el término "promotor" incluye a lo que se refiere en la técnica como una región promotora corriente arriba, una región promotora o un promotor de una unidad de transcripción de polimerasa II de ARN eucariótico generalizado.

Otro tipo de elemento de secuencia reguladora de transcripción discreta es un mejorador. Un mejorador suministra especificidad de tiempo, ubicación y nivel de expresión para una región de codificación particular (por ejemplo, gen). Una función mayor de un mejorador es para incrementar el nivel de transcripción de una secuencia de codificación en una célula que contiene uno o más factores de transcripción que se unen a ese mejorador. Así mismo un promotor, un mejorador pueden funcionar

nn 278
7x3

cuando se ubican en distancias variables de los sitios de inicio de transcripción mientras esta presente un promotor.

Como se utiliza aquí en adelante, la frase "promotor-mejorador" significa una unidad compuesta que contiene elementos mejoradores y promotores. Un promotor-mejorador se liga operativamente a una secuencia de codificación que codifica al menos un producto de gen. Como se utiliza aquí en adelante, la frase "ligado operativamente" significa que un promotor-mejorador se conecta a una secuencia de codificación en tal una forma que la transcripción de esta secuencia de codificación se controla y regula por ese promotor-mejorador. Medios para ligar operativamente un promotor-mejorador para una secuencia de codificación se conoce bien en el arte. También son bien conocidos en el arte, la orientación precisa y ubicación relativa para una secuencia de codificación cuya transcripción se controla, es dependiente *inter alia* de la naturaleza específica del promotor-mejorador. Así, un promotor mínimo de caja TATA se ubica típicamente de aproximadamente 25 a aproximadamente 30 pares base corriente arriba de un sitio de iniciación de transcripción y un elemento promotor corriente arriba se ubica típicamente de aproximadamente 100 a aproximadamente 200 pares base corriente arriba de un sitio de iniciación de transcripción. En contraste, un mejorador se puede ubicar corriente abajo del sitio de iniciación y puede estar en una distancia considerable ese sitio.

Un promotor-mejorador utilizado en una construcción de vector descrita aquí puede ser cualquier promotor-mejorador que controle la expresión en una célula a ser transfectada. Al emplear un promotor-mejorador con propiedades bien conocidas, el nivel y el patrón de la expresión de producto de gen se pueden optimizar.

Por ejemplo, promotores comúnmente utilizados se derivan del poliovirus, Adenovirus 2, citomegalovirus y Virus de Simio 40. Para otros sistemas de expresión adecuados para células procarióticas y eucarióticas ver capítulos 16 y 17 de Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" 2nd, ed, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, incorporado aquí en adelante como referencia.

En otra modalidad, el vector de expresión de mamífero recombinante es capaz de dirigir la expresión del ácido nucleico preferencialmente en un tipo de célula particular (por ejemplo, se utilizan elementos reguladores específicos de tejido para expresar el ácido nucleico). Los elementos reguladores específicos del tejido se conocen en el arte. Ejemplos no limitantes de promotores específicos de tejido adecuado incluyen el promotor albúmina (liver-specific; Pinkert et al., Genes Dev, 1: p. 268-277, 1987), promotores linfoides específicos (Calame and Eaton, Adv Immunol, 43: p. 235-275, 1988), en particular, promotores de receptores de célula T (Winoto and Baltimore, EMBO J, 8: p. 729-733, 1989) e inmunoglobulinas (Banerji et al., Cell,

33: p. 729-740, 1983), (Queen y Baltimore, Cell, 33: p. 741-748, 1983), promotores neuro-específicos (por ejemplo, the neurofilament promoter; Byrne y Ruddie, PNAS, 86: p. 5473-5477, 1989), promotores específicos de páncreas (Edlund et al., Science, 230: p. 912-916, 1985), y promotores específicos de glándula mamaria (por ejemplo, milk whey promoter; U.S. Patent 4,873,316 y International Application EP 264,166). Promotores de desarrollo regulado también se encuentran abarcados, por ejemplo los promotores hox murino (Kessel y Gruss, Science, 249: p. 374-379, 1990) y el promotor α -fetoproteína (Campes y Tilghman, Genes Dev, 3: p. 537-546, 1989).

También se suministra aquí un vector de expresión recombinante que comprende una molécula de ADN que codifica un polipéptido de *Staphylococcus epidermidis* clonado en el vector de expresión en una orientación antisentido. Esto es, la molécula de ADN se liga operativamente a una secuencia reguladora en una forma que permite la expresión (por transcripción de la molécula de ADN) de una molécula de ARN que es antisentido para mRNA *Staphylococcus epidermidis*. Secuencias reguladoras ligadas operativamente a un ácido nucleico clonado en la orientación antisentido se puede escoger la cual dirige la expresión continúa de la molécula de ARN antisentido en una variedad de tipos celulares. Por ejemplo promotores virales y/o mejoradores o secuencias reguladoras se pueden escoger que dirigen la expresión específica de tipo celular o específica de tejido, constitutiva de ARN antisentido. El vector de expresión antisentido puede estar en la forma de un plásmido recombinante, fagénido o virus

atenuado en el que los ácido nucleicos antisentido se producen bajo el control de una región reguladora de alta eficiencia, la actividad de la cual se puede determinar mediante el tipo celular en el que se introduce el vector. nn
726

Los vectores de expresión recombinante descritos aquí se pueden insertar en cualquier célula huésped adecuado. Los términos "célula huésped" y "células huésped recombinantes" se utilizan intercambiabilmente aquí. Se entiende que tales términos se refieren no solo a la célula objetivo o objeto particular, sino a la progenie o progenie potencial de tal una célula. Debido a que ciertas modificaciones pueden ocurrir en generaciones posteriores debido a la mutación o influencias ambientales, tal progenie no puede, de hecho, ser idéntica a la célula pariente, pero aun se incluyen dentro del alcance del término como se utiliza aquí. Una célula huésped puede ser cualquier célula procariótica o eucariótica. Por ejemplo, un polipéptido de *Staphylococcus epidermidis* se puede expresar en células bacterianas tal como *E. coli*, células de insectos (tal como Sf9, Sf21), células de mamífero o almidón (tal como células de ovario de hámster chino (CHO), célula VERO, fibroblastos de embriones de pollo, células BHK o células COS). Otras células de huésped adecuadas son bien conocidas por aquellos expertos en la técnica.

El ADN de vector se introduce en las células procarióticas eucarióticas por técnicas de transfección, infección o transformación convencional. Como se utiliza aquí, los términos "transformación" y "transfección" están destinados a referirse a

una variedad de técnicas reconocidas por el arte para introducir ácido nucleico externo (por ejemplo, ADN) en una célula huésped, que incluyen fosfato de calcio coprecipitación de cloruro de calcio, transfección mediada por dextrano DEAE, lipofección, ultrasonido o electroporación. Métodos adecuados para transformar o transfectar células huésped se pueden encontrar en Sambrook, et al. ("Molecular Cloning: A Laboratory Manual" 2nd, ed, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989), y otros manuales de laboratorio.

Una célula huésped descrita aquí, tal como una célula huésped eucariótica o procariótica en cultivo, se utiliza para producir (es decir, expresar) un polipéptido *Staphylococcus epidermidis*. De acuerdo con esto, también se describen aquí métodos para producir un polipéptido *Staphylococcus epidermidis* utilizando tales células huésped. En una modalidad, el método comprende cultivar la célula huésped (en la que un vector de expresión recombinante que codifica un polipéptido *Staphylococcus epidermidis* se ha introducido) en un medio adecuado hasta que se produce el polipéptido *Staphylococcus epidermidis*. En otra modalidad, el método comprende adicionalmente aislar el polipéptido *Staphylococcus epidermidis* del medio o la célula huésped.

Una secuencia de codificación de un vector de expresión se liga operativamente a una región de terminación de transcripción. La polimerasa ARN transcribe una secuencia de ADN de codificación a través de un sitio en donde ocurre la poliadenilación.

Típicamente, las secuencias de ADN ubicadas uno pocos cientos de pares base corriente abajo del sitio de poliadenilación sirven para terminar la transcripción. Aquellas secuencias de ADN son referidas de aquí en adelante como regiones de terminación de transcripción. Aquellas regiones se requieren para poliadenilación eficiente de ARN mensajero transcripto (mARN). Las regiones de transcripción-terminación son bien conocidas en la técnica. Ejemplos de tales regiones de transcripción-terminación son señales de poliadenilación de SV40 y el gen protamina.

Un vector de expresión comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido *Staphylococcus epidermidis*. Tal un polipéptido significa que incluye una secuencia de nucleótidos base que codifican un polipéptido *Staphylococcus epidermidis* suficiente en longitud para distinguir el segmento de un segmento de polinucleótido que codifica un polipéptido no *Staphylococcus epidermidis*. Tal un polipéptido puede también codificar polipéptidos funcionales biológicamente o péptidos que tienen secuencias de aminoácido variante, tal como cambios seleccionados basados en consideraciones tal como clasificación hidropática relativa de los aminoácidos que se intercambian. Estas secuencias variantes son aquellas aisladas de fuentes naturales o inducidas en las secuencias descritas aquí adelante utilizando un procedimiento mutagénico tal como mutagénesis dirigida al sitio.

En ciertas modalidades, los vectores de expresión descritos aquí comprenden polinucleótidos que codifican polipéptidos que

nn 204

179

comprenden la secuencia de residuo de aminoácido de una de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 32. Un vector de expresión puede incluir un polipéptido *Staphylococcus epidermidis* que codifica la región en si misma de cualquiera de los polipéptidos *Staphylococcus epidermidis* anotados anteriormente o este puede contener regiones de codificación que llevan alteraciones seleccionadas o modificaciones en la región de codificación básica de tal un polipéptido *Staphylococcus epidermidis*. Alternativamente, tales vectores o fragmentos pueden codificar polipéptidos o polipéptidos mayores que no obstante incluyen la región de codificación básica. En cualquier evento, se debe apreciar que debido a redundancia de codón así como también la equivalencia funcional biológica, este aspecto no se limita a las moléculas de ADN particulares que corresponden a las secuencias de polipéptido anotadas anteriormente.

Vectores de ejemplo incluyen los vectores de expresión mamífero de la familia pCMV que incluyen pCMV6b y pCMV6c (Chiron Corp., Emeryville CA.). En ciertos casos, y específicamente en el caso de estos vectores de expresión de mamífero individual, las construcciones resultantes pueden requerir contranfección con un vector que contiene un marcador seleccionable tal como pSV2neo. La vía de co-transfección en una línea celular de ovario de hámster Chino de reductasa-deficiente dihidrofolato, tal como DG44, se pueden detectar clones que expresan polipéptidos *Staphylococcus epidermidis* por virtud del ADN incorporado en tales vectores de expresión.

Una molécula de ADN se puede incorporar en un vector mediante un número de técnicas que son bien conocidas en el arte. Por ejemplo, el vector pUC18 ha demostrado ser de valor particular en clonación y expresión de genes. Probablemente, los vectores relacionados M13mp18 y M13mp19 se pueden utilizar en ciertas modalidades de la invención, en particular, en desarrollo de secuenciamiento dideoxi.

Un vector de expresión descrito aquí es útil como un medio para preparar cantidades de ADN que codifican polipéptido *Staphylococcus epidermidis*, y como un medio para preparar péptidos y polipéptidos codificados. Se contempla que en donde los polipéptidos *Staphylococcus epidermidis* se hacen por medios recombinantes, uno puede emplear vectores de expresión procariótica eucariótica como sistemas transportadores.

En otro aspecto, las células huésped recombinantes son células huésped procarióticas. Preferiblemente, las células huésped recombinantes de la invención son células bacterianas de la cepa α DH5 de *Escherichia coli*. En general, se prefieren procariotes para la clonación inicial de secuencia ADN y construir los vectores útiles en la invención. Por ejemplo, las cepas K12 *E. coli* pueden ser particularmente útiles. Otras cepas microbianas que se pueden utilizar incluyen *E. coli* B, y *E. coli* 1976 (ATCC No. 31537). Estos ejemplos están, por supuesto, destinados a ser ilustrativos a diferencia de limitativos.

... 00206
101

Las cepas mencionadas anteriormente, así como también *E. coli* W3110 (ATCC No. 273325), *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* Top10, bacilos tales como *Bacillus subtilis*, u otras enterobacterias tales como *Salmonella typhimurium* (u otras cepas de *Salmonella* atenuadas como se describe en la Patente Estadounidense 4,837,151) o *Serratia marcesans*, y varias especies de *Pseudomonas* se pueden utilizar.

En general, los vectores de plásmido que contienen secuencias de control y replicón, que se derivan de especies compatibles con las células huésped se utilizan en relación con estos huéspedes. El vector lleva ordinariamente un sitio de replicación, así como también secuencias marcadoras que son capaces de suministrar selección fenotípica en células transformadas. Por ejemplo, *E. coli* se puede transformar utilizando pBR322, un plásmido derivado de una especie *E. coli* (Bolivar, et al. 1977). pBR322 que contiene genes para resistencia a la ampicilina y tetraciclina y así suministra medios fáciles para identificar células transformadas. El plásmido pBR, u otro plásmido microbiano o fago también debe contener, o ser modificado para contener, promotores que se pueden utilizar por organismos microbianos para expresión de sus propios polipéptidos.

Aquellos promotores más comúnmente utilizados en la construcción de ADN recombinante incluyen la β -lactamasa (penicilinas) y sistemas promotores de lactosa (Chang, et al. 1978; Itakura., et al. 1977, Goeddel, et al. 1979; Goeddel, et

al. 1980) y un sistema promotor de triptofan (TRP) (EP 0036776; Siebwenlist et al. 1980). Mientas estos son los más comúnmente utilizados, otros promotores microbianos se han descubierto y utilizado, y detalles relacionados con sus secuencias de nucleótidos se han publicado, permitiendo a un trabajador experto introducir promotores funcionales dentro de vectores plásmidos (Siebwenlist, et al. 1980).

En adición a los microbios procariotes, eucarióticos tales como la levadura también se pueden utilizar. El *Saccharomyces cerevisiae* o levadura de panadería común es el más comúnmente utilizado entre los microorganismos eucarióticos, aunque un número de otras cepas están comúnmente disponibles. Para expresión en saccharomices, el plásmido YRp7, por ejemplo, se utiliza comúnmente (Stinchcomb, et al. 1979; Kingsman, et al. 1979; Tschemper, et al. 1980). Este plásmido ya contiene el gen *trp1* que suministra un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que le falta la capacidad de crecer en triptofan, por ejemplo ATCC No. 44076 o PEP4-1 (Jones, 1977). En la presencia de la lesión *trp1* como una característica del genoma de célula huésped de levadura suministra entonces un ambiente efectivo para detectar transformación por crecimiento en la ausencia de triptofan.

Secuencias promotores adecuadas en vectores de levadura incluyen los promotores para quinasa 3-fosfoglicerato (Hitzeman., et al. 1980) u otras enzimas glicolíticas (Hess, et al. 1968; Holland, et al. 1978) tal como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato

nnb

183

deshidrogenasa, hexoquinasa, descarboxilasa piruvato, fosfofructoquinasa, isomerasa glucosa-6-fosfato, 3-fosfoglicerato mutasa, quinasa piruvato, isomerasa triosefosfato, isomerasa fosfoglucosa, y glucoquinasa. En la construcción de plásmidos de expresión adecuada, las secuencias de terminación asociadas con estos genes también se introducen en el vector de expresión corriente debajo de las secuencias a ser expresadas para suministrar poliadenilación del mRNA y terminación. Otros promotores, que tienen la ventaja adicional de transcripción controlada por condiciones de crecimiento son regiones promotoras para alcohol deshidrogenada 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradantes asociadas con metabolismo de nitrógeno, y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas mencionadas anteriormente responsables para la utilización de maltosa y galactosa. Cualquier vector de plásmido que contiene un promotor compatible con levadura, origen o secuencias de replicación o terminación son adecuadas.

En adición a los microorganismos, cultivos de células derivados de organismos multicelulares también se pueden utilizar como huéspedes. En principio, cualquier tal cultivo celular es trabajable sea de cultivo vertebrado o invertebrado. Sin embargo, ha existido gran interés en células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en cultivos (cultivos de tejidos) ha llegado a ser un procedimiento de rutina en años recientes. Ejemplos de tales líneas celulares de huésped útiles son AtT-20, VERO, HeLa, NSO, PER C6, líneas celulares de ovario de hámster Chino (CHO), y líneas celulares W138, BHK, COSM6, COS-

... nn24g

7, 293 y MDCK. Los vectores de expresión para tales células incluyen ordinariamente (si es necesario) un origen de replicación, un promotor ubicado corriente arriba del gen a ser expresado, junto con cualquier sitio de unión de ribosoma necesario, sitios de separación de ARN, sitios de poliadenilación, y secuencias terminadoras transcripcionales.

134

Cuando la expresión de polipéptidos *Staphylococcus epidermidis* recombinantes se desea y un huésped eucariótico se contempla, es más deseable emplear un vector tal como un plásmido que incorpora un origen eucariótico de replicación. Adicionalmente, para los propósitos de expresión en sistemas eucarióticos, uno desea posicionar la secuencia de codificación de *Staphylococcus epidermidis* adyacente a y bajo el control de un promotor eucariótico efectivo tal como promotores utilizados en combinación con células de ovario de hámster Chino. Llevar una secuencia de codificación bajo control de un promotor, sea este eucariótico o procariótico, el extremo 5' de la región de iniciación de traducción del cuadro de lectura de traducción apropiado del polipéptido se debe posicionar entre aproximadamente 1 y aproximadamente 50 nucleótidos 3' de o corriente abajo con respecto al promotor seleccionado. Adicionalmente, en donde la expresión eucariótica se anticipe, uno podría típicamente desear incorporar dentro de la unidad de transcripción un polinucleótido que codifica el polipéptido *Staphylococcus epidermidis*.

nn298

185

Medios de transformación o transfección celular con polinucleótido exógeno tal como moléculas de ADN son bien conocidos en la técnica e incluyen técnicas tales como transfección mediada por dextrano-DEAE o calcio-fosfato, fusión de protoplastos electroporación, transfección mediada por liposoma, microinyección directa e infección por adenovirus (ver por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, 1989).

El método más ampliamente utilizado es la transfección mediada por fosfato calcio o dextrano-DEAE aunque el mecanismo permanece oscuro, se cree que el ADN transfectado entra al citoplasma de la célula por endocitosis y se transporta al núcleo. Dependiendo del tipo celular, hasta el 90% de una población de células cultivadas se puede transfectar de una sola vez. Debido a que esto es altamente eficiente, la transfección mediada por fosfato de calcio o dextrano-DEAE es el método de elección para experimentos que requieren expresión transitoria del ADN externo en grandes números de células. La transfección mediada por fosfato de calcio también se utiliza para establecer líneas celulares que integran copias del ADN externo, que están usualmente dispuestas en ensayos de tándem cabeza a cola en el genoma celular del huésped.

En el método de fusión de protoplasto, protoplastos derivados de bacterias que llevan altos números de copias de un plásmido de interés se mezclan directamente con células de mamífero cultivadas. Después de la fusión de las membranas celulares (usualmente con polietilenglicol), los contenidos de

las bacterias se suministran en el citoplasma de las células de mamíferos y el ADN plásmido se transporta al núcleo. La fusión de protoplastos no es tan eficiente como la transfección para muchas de las líneas celulares que se utilizan comúnmente para ensayos de expresión transitoria, pero es útil para líneas celulares en el que la endocitosis de ADN ocurre ineficientemente. La fusión de protoplastos produce frecuentemente múltiples copias del ADN de plásmido en tándem integrado en el cromosoma del huésped.

La aplicación de pulsos eléctricos de altos voltajes breves a una variedad de células de plantas y mamíferos conduce a la formación de poros de tamaño de nanómetro en la membrana del plasma. El ADN se lleva directamente al citoplasma celular ya sea a través de estos poros o como una consecuencia de la redistribución de componentes de membrana que acompaña el cierre de los poros. La electroporación puede ser extremadamente eficiente y se puede utilizar para expresión transitoria de genes clonados y para el establecimiento de líneas celulares que llevan copias integradas del gen de interés. La electroporación en contraste con la transfección mediada por fosfato de calcio y la fusión de protoplastos, frecuentemente eleva las líneas celulares que llevan una, o al menos unas pocas, copias integradas del ADN externo.

La transfección de liposoma involucra la encapsulación de ADN y ARN dentro de liposomas, seguido por la fusión de los liposomas con la membrana celular. El mecanismo de cuanto ADN se

suministra en la célula no es claro pero la eficiencia de transfección puede ser tan alta como el 90%.

00202
177

La microinyección directa de una molécula de ADN en el núcleo tiene la ventaja de no exponer el ADN a compartimientos celulares tales como endosomas bajos en pH. La microinyección se utiliza por lo tanto principalmente como un método para establecer líneas de células que llevan copias integradas del ADN de interés.

El uso del adenovirus como un vector para transfección celular es bien conocido en la técnica. La transfección celular mediada por vector adenovirus se ha reportado para varias células (Stratford-Perricaudet, et al. 1992).

Una célula transfectada puede ser procariótica o eucariótica. Preferiblemente, las células huésped de la invención son células huésped procarióticas. En donde es de interés producir un polipéptido *Staphylococcus epidermidis*, las células huésped procarióticas cultivadas son de particular interés.

También se contempla aquí un proceso o método para preparar polipéptidos *Staphylococcus epidermidis* que comprende transformar, transfectar o infectar células con un polinucleótido que codifica un polipéptido *Staphylococcus epidermidis* para producir células huésped transformadas; y mantener las células huésped transformadas bajo condiciones biológicas suficientes para expresión del polipéptido. En una modalidad particular, las

- 00903
488

células huésped transformadas son células procarióticas. Alternativamente, las células huésped son células eucarióticas. Más particularmente las células procarióticas son células bacterianas de la cepa DH5- α de *Escherichia coli*. Alternativamente, el polinucleótido transfectado en las células transformadas comprende la secuencia de ácido nucleico de una de la SEQ ID NO: 33 a la SEQ ID NO: 64. Adicionalmente, la transfección se logra utilizando un vector de expresión descrito anteriormente. Una célula huésped utilizada en el proceso es capaz de expresar un polipéptido de *Staphylococcus epidermidis* recombinante, funcional.

Luego de transfección, la célula se mantiene bajo condiciones de cultivo durante un periodo de tiempo suficiente para expresión de un polipéptido *Staphylococcus epidermidis*. Las condiciones de cultivo son bien conocidas en la técnica e incluyen composición iónica y concentración, temperatura, ph y similares. Típicamente, las células transfectadas se mantienen bajo condiciones de cultivo en un medio de cultivo. Medios adecuados para varios tipos celulares son bien conocidos en la técnica. En ciertas modalidades, la temperatura de cultivo es de aproximadamente 20°C a aproximadamente 50°C, más preferiblemente de cerca 30°C a aproximadamente 40°C y aún más preferiblemente cerca de 37°C.

El ph es preferiblemente de cerca de un valor de 6.0 a un valor de aproximadamente 8.0, más preferiblemente de cerca de un valor de aproximadamente 6.8 a un valor de aproximadamente 7.8 y,

más preferiblemente cerca de 7.4. La osmolalidad es preferiblemente de cerca de 200 miliosmoles por litro (MOSM/L) a aproximadamente 400 MOSM/L y, más preferiblemente de cerca de 290 MOSM/L aproximadamente 310 MOSM/L. Otras condiciones biológicas necesarias para transfección y expresión de una proteína codificada son bien conocidas en la técnica.

Las células transfectadas se mantiene durante un periodo de tiempo suficiente para expresión de un polipéptido *Staphylococcus epidermidis*. Un tiempo adecuado depende *inter alia* del tipo celular utilizado y es fácilmente determinable por un experto en la técnica. Típicamente, el tiempo de mantenimiento es de aproximadamente 2 a aproximadamente 14 días.

El polipéptido recombinantes *Staphylococcus epidermidis* se recupera o recolecta de las células transfectadas o el medio en el que aquellas células se cultivan. La recuperación comprende aislar y purificar el polipéptido *Staphylococcus epidermidis*. Las técnicas de aislamiento y purificación para polipéptidos son bien conocidas en el arte e incluyen aquellos procedimientos como precipitación, filtración, cromatografía, electrofóresis y similares.

E. Composiciones inmunogénicas

La presente invención suministra composiciones inmunogénicas que comprenden uno o más polipéptidos de *Staphylococcus epidermidis* seleccionado como se describe en los ejemplos

. . 00905
190

adelante, y portadores fisiológicamente aceptables. En ciertas modalidades, las composiciones inmunogénicas comprende uno o más polipéptidos de *Staphylococcus epidermidis* que comprenden la secuencia de residuo de aminoácidos de una o más de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 32. En otras modalidades, las composiciones inmunogénicas de la invención comprenden polinucleótidos que codifican polipéptidos *Staphylococcus epidermidis*, y portadores fisiológicamente aceptables. Por ejemplo, las composiciones inmunogénicas de la presente invención comprenden polipéptidos *Staphylococcus epidermidis* que comprenden la secuencia de aminoácido de una o más de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 32. Alternativamente, las composiciones inmunogénicas comprenden polinucleótidos que comprenden la secuencia de nucleótido de una o más de la SEQ ID NO: 33 a la SEQ ID NO: 64.

Se utilizan varios ensayos para evaluar la inmunogenicidad *in vitro* de los polipéptidos de la invención. Por ejemplo, un ensayo opsónico *in Vitro* se conduce al incubar juntos una mezcla de células de *Staphylococcus epidermidis*, calentar el suero humano inactivo que contiene anticuerpos específicos para el polipéptido en cuestión, y una fuente de complemento exógena. La opsonofagocitosis avanza durante la incubación de células polimorfonucleares humanas aisladas frescas (PMN) y la mezcla celular anticuerpo/complemento/*Staphylococcus*. Células bacterianas que se recubren con anticuerpo y se complementan se matan luego de opsonofagocitosis. Las unidades formadoras de colonia (cfu) de bacterias sobrevivientes que escapan de la opsonofagocitosis se determinan al platear la mezcla de ensayos.

- 00248

101

Los títulos se reportan como el recíproco de la mayor dilución que da $\geq 50\%$ de muerte bacteriana, como se determina por comparación para controles de ensayo. Los especímenes que demuestran menos de 50% de muertes en la dilución de suero más baja ensayada (1:8), se reportan por tener un título OPA de 4. la mayor dilución ensayada es 1:2560. Muestras con muerte $\geq 50\%$ en la mayor dilución se repiten, empezando con una dilución inicial mayor. El método descrito anteriormente es una modificación del método de Gray (Gray, Conjugate Vaccines Supplement, p. 694-697, 1990).

Un control de suero de ensayo, que contiene suero de ensayo más células bacterianas y complemento inactivo caliente, se incluyen para cada suero individual. Este control se utiliza para evaluar si la presencia de antibióticos u otros componentes de suero son capaces de matar directamente las cepas bacterianas (es decir en la ausencia de complemento o PMN). Un suero humano con título opsónico conocido se utiliza como un control de suero humano positivo. El título de anticuerpo opsónico para cada suero desconocido se calcula como el recíproco de la dilución inicial de suero dada la reducción del 50% de cfu comparado con el control sin suero.

Un ensayo ELISA de célula completa también se utiliza para evaluar la inmunogenicidad *in vitro* y la exposición de superficie del antígeno de polipéptido, en donde la cepa bacteriana de interés (*Staphylococcus epidermidis*) se cubre sobre una placa, tal como una placa de 96 pozos, y el suero de ensayo de un animal

inmunizado se hace reaccionar con las células bacterianas. Si cualquier anticuerpo, específico para el antígeno de polipéptido de ensayo, es reactivo con un epítipo expuesto de superficie del antígeno de polipéptido, este se puede detectar mediante métodos estándar conocidos por un experto en la técnica. - nntas
192

Cualquier polipéptido que demuestre la actividad *in vitro* deseada es luego ensayado en un modelo inoculado de animal *in vivo*. En ciertas modalidades, las composiciones inmunogénicas se utilizan en la inmunización de una animal (por ejemplo, un ratón) mediante los métodos y rutas de inmunización conocidos por aquellos expertos en la técnica (por ejemplo, intranasal, parenteral, oral, rectal, vaginal, transdérmica, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, etc.). Luego de la inmunización del animal con una composición inmunogénica particular de *Staphylococcus epidermidis*, el animal es inoculado con *Staphylococcus epidermidis* y se le ensaya la resistencia a la infección por *Staphylococcus epidermidis*.

Los polinucleótidos y los polipéptidos de *Staphylococcus epidermidis* están incorporados en composiciones inmunogénicas adecuadas para la administración a un sujeto, por ejemplo, un humano. Tales composiciones comprenden típicamente la molécula de ácido nucleico o la proteína, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se utiliza en los sucesivos el lenguaje "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende incluir cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y fungosos, agentes

isotónicos y de retraso de absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas son bien conocidas en la técnica. Excepto hasta ahora como cualquier medio o agente convencional es incompatible con el compuesto activo, tal medio puede ser utilizado en las composiciones de la invención. Los compuestos activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

Una composición inmunogénica de la invención se formula para ser compatible con su ruta destinada de administración. Ejemplos de rutas de administración incluyen la parenteral (por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal), transmucosa (por ejemplo, oral, rectal, intranasal, vaginal, respiratoria) y transdérmica (tópica). Las soluciones o suspensiones utilizadas para la aplicación parenteral, intradérmica, o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijados, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros solventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como bencil alcohol o metil parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilenodiaminotetraacético; amortiguadores tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tal como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral

nnsg
193

se puede incluir en ampollas, jeringas desechables o frascos de múltiples dosis hechos de vidrio o plástico.

nnzag
794

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (donde sean solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremofor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina amortiguada de fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la proporción en que exista una fácil aplicación con jeringa. Debe ser entendible bajo las condiciones de elaboración y almacenamiento y se debe preservar contra la acción contaminante de los microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un solvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de este. La fluidez propia se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensoactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede lograr mediante varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, y similares. En muchos casos, los agentes isotónicos están incluidos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como

manitol, sorbitol, cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede llevar a incluir en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar al incorporar el compuesto activo (por ejemplo, un polipéptido de *Staphylococcus epidermidis* o un anticuerpo anti- *Staphylococcus epidermidis*) en la cantidad requerida en un solvente apropiado con una o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requieran, seguidos por esterilización filtrada. En general, las dispersiones se preparan al incorporar el compuesto activo en un vehículo estéril que contenga un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado por vacío y secado por congelamiento que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional proveniente de la solución previamente filtrada estéril de esta.

Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un vehículo comestible. Ellos se pueden incluir en cápsulas de gelatina o comprimir en tabletas. Para los propósitos de la administración terapéutica oral, el compuesto activo se puede incorporar con excipientes y utilizar en la forma de tabletas, trociscos, o cápsulas. Las composiciones orales también se pueden preparar utilizando un vehículo fluido para el uso como

nn 191
196

un enjuague bucal, en donde el compuesto en el vehículo fluido se aplica oralmente y chasqueado y expectorado o tragado. Los agentes de unión farmacéuticamente compatibles, y/o los materiales adyuvantes se pueden incluir como parte de la composición. Las tabletas, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un ligador tal como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente desintegrante tal como ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Esterotes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente endulzante tal como sucrosa o sacarina; o un agente saborizante tal como pimienta, metil salicilato, saborizante de naranja.

Para la administración mediante inhalación, los compuestos se suministran en la forma de un pulverizado de aerosol proveniente de un recipiente presurizado o un dispensador que contiene un propulsor adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador. La administración sistémica también puede ser por medios de transmucosa o transdérmicos. Para la administración transmucosa o transdérmica, los penetrantes apropiados a la barrera a ser perneada se utilizan en la formulación. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración de transmucosa, detergentes, sales biliares, y derivados de ácido fusídico. La administración de transmucosa se puede lograr a través del uso de pulverizados nasales o supositorios. Para la

nnn2

197

administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en ungüentos, pomadas, geles, o cremas como se conocen generalmente en la técnica.

Los compuestos también se pueden preparar en la forma de supositorios (por ejemplo, con bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para el suministro rectal.

En una modalidad, los compuestos activos se preparan con vehículos que protegerán el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como la formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de suministro microencapsulado.

Se pueden utilizar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etileno vinil acetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para aquellos expertos en la técnica. Los materiales también se pueden obtener comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposomales (que incluyen los liposomas destinados a células infectadas con anticuerpos monoclonales a antígenos virales) también se pueden utilizar como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos se pueden preparar de acuerdo con los métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la

Patente U.S. 4,522,811, que se incorpora en lo sucesivo como referencia.

nn 303
198

Es especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de dosis unitaria para la fácil administración y la uniformidad de la dosis. La forma de dosis unitaria como se utiliza en lo sucesivo se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para el sujeto a ser tratado; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asocio con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación de las formas unitarias de dosis de la invención son dictadas por y directamente dependientes de las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular a ser logrado, y las limitaciones inherentes en la técnica de compuestos tales como un compuesto activo para el tratamiento de individuos.

La combinación de composiciones inmunogénicas se suministra al incluir dos o más de los polipéptidos de la invención, así como también al combinar uno o más de los polipéptidos de la invención con uno o más de los polipéptidos no *Staphylococcus epidermidis* conocidos tales como los polipéptidos de *Staphylococcus aureus*.

Las siguientes doce secuencias de polipéptido de *Staphylococcus epidermidis* SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO:

.. 000004

199

19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, y SEQ ID NO: 30 tienen secuencias de polipéptido con al menos 90% de identidad con los homólogos provenientes de *Staphylococcus aureus*. Por lo tanto, estos doce polipéptidos también se pueden utilizar en composiciones inmunogénicas contra *Staphylococcus aureus*. Además, las siguientes doce secuencias de polinucleótido *Staphylococcus epidermidis* que codifican los polipéptidos con al menos el 90% de identidad a los homólogos de *Staphylococcus aureus* también se pueden utilizar en composiciones inmunogénicas: SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, y SEQ ID NO: 62, o una variante degenerada de este, o un fragmento de este.

En otras modalidades, la combinación de las composiciones inmunogénicas se suministra al combinar uno o más de los polipéptidos de la invención con uno o más de los polisacáridos o conjugados de polisacárido-proteína de *S. epidermidis* conocidos. Ver, por ejemplo, la adhesina de polisacárido capsular de *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus*, PNSG, poli-N-succinil beta-1-6 N-acetil glucosamina (también conocida como PIA, PS/A, PNAG). Ver Mckenney, D., et al., *Infect. Immun.* 66:4711 (1998) y Mckenney, D., et al., *Science* 284:1523 (1998), cuyas descripciones se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

En otras modalidades, la combinación de las composiciones inmunogénicas se suministra al combinar uno o más polipéptidos de

la invención con uno o más polisacáridos de *S. aureus* o conjugados de polisacárido-proteína de *S. aureus*. Por ejemplo, de los 12 serotipos capsulares conocidos de *S. aureus*, el serotipo 5 (CP5) y el serotipo 8 (CP8) cuenta con aproximadamente el 85-90% de todos los aislados clínicos []. La mayoría de los aislados de *S. aureus* resistentes a meticilina expresan CP5]. Los anticuerpos a CP5 y CP8 inducen muerte opsonofagocítica específica del tipo mediante neutrófilos polimorfonucleares humanos *in Vitro* y confieren protección en animales [Karakawa, W. W., Sutton, A., et al., *Infect Immun* 56(5):1090-1095 (1988); Fattom, A. I., Sarwar, J., et al., *Infection & Immunity* 64(5):1659-1665 (1996)]. Varios laboratorios han sintetizado conjugados inmunogénicos que consisten de CP5 y CP8 covalentemente ligados a proteína.

Estos conjugados son altamente inmunogénicos en ratones y humanos e inducen anticuerpos que opsonizan *S. aureus* microencapsulado para fagocitosis [Fattom, A., Schneerson, R, et al., *Infect Immun* 61(3):1023-1032 (1993); Gilbert, F. B., Poutrel, B., et al., *Vaccine* 12(4):369-374 (1994); Reynaud-Rondier, L., Voiland, A., et al., *FEMS Microbiol Immunol* 3(4):193-199 (1991)]. Las composiciones inmunogénicas monovalentes que contienen CP5 conjugadas a exotoxina A recombinante de *Pseudomonas aeruginosa* son inmunogénicas y bien toleradas en adultos saludables y en pacientes con enfermedad renal en etapa Terminal [Welch, P. G., Fattom, A., Moore, J. Jr., et al., *J. Am. Soc. Nephrol.* 7:247-253 [Abstract] (1996)]. En un ensayo doble ciego que involucra pacientes con enfermedad renal en etapa Terminal que estaban recibiendo hemodiálisis, una vacuna de conjugado bivalente

compuesta de CP5 y CP8 covalentemente unida a exotoxina A recombinante de *Pseudomonas aeruginosa* le confirieron inmunidad parcial contra bacteremia de *S. aureus* durante aproximadamente 40 semanas, después de lo cual la protección disminuyó en la medida en que los niveles de anticuerpo disminuyeron [Shinefield, H., Black, S., et al., *N Engl J Med* 346(7):491-496 (2002)]. El resultado de este ensayo indica una necesidad de una composición inmunogénica mejorada que podría contribuir a una protección más amplia y más completa.

Como se describe anteriormente, en ciertas modalidades, la combinación de las composiciones inmunogénicas se suministra al combinar uno o más polipéptidos de la invención con uno o más conjugados de polisacárido-proteína de *S. aureus* conocidos. El "componente de proteína" de los conjugados de carbohidrato-proteína es conocido como una proteína vehículo. El término "proteínas vehículo", como un grupo son preferiblemente proteínas que son no tóxicas y no reactogénicas y obtenibles en cantidad y pureza suficiente. Las proteínas vehículo deben ser tratables en procedimientos de conjugación estándar. En una modalidad particular de la presente invención, el CRM₁₉₇ se utiliza como la proteína vehículo. El CRM₁₉₇ (Wyeth, Sanford, NC) es una variante no tóxica (es decir, toxoide) de toxina de difteria aislada de los cultivos de la sepa de *Corynebacterium diphtheria* C7 (β197) crecida en ácidos casamino y medio basado en extracto de levadura. El CRM₁₉₇ se purifica a través de ultra-filtración, precipitación de sulfato de amonio, y cromatografía de intercambio de ión. Otros toxoides de difteria también son

202
000007

adecuados para uso como proteínas vehículo. La composición inmunogénica puede además comprender un adyuvante, tal como un adyuvante basado en aluminio, tal como fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio.

Otras proteínas vehículo adecuadas incluyen toxinas bacterianas inactivadas tales como toxoide de tétano, toxoide pertussis, toxoide de cólera (por ejemplo, como se describe en la Solicitud de Patente Internacional WO2004/083251 [38]), *E. coli* LT, *E. coli* ST, y exotoxina A proveniente de *Pseudomonas aeruginosa*. Las proteínas de la membrana exterior bacteriana tales como el complejo c de la membrana exterior (OMPC), purinas, proteínas de unión de transferrina, neumolisis, proteína A de superficie de neumococco (PspA), proteína de adhesina de neumococco (PsaA), o proteína D de *Haemophilus influenza*, también se pueden utilizar. Otras proteínas, tales como ovalbúmina, hemocianina de lapa huecodellave (KLH), sero albúmina bovina (BSA) o derivado de proteína purificada de tuberculina (PPD) también se pueden utilizar como proteínas vehículo.

Las composiciones inmunogénicas que comprenden los polinucleótidos se suministran al receptor mediante una variedad de vectores y sistemas de expresión. Tales sistemas incluyen, entre otros, los sistemas cromosómicos, episomales y derivados de virus, por ejemplo, vectores derivados de plásmidos bacterianos, las bacterias atenuadas tales como *Salmonella* (Patente U.S. 4,837,151), proveniente de bacteriófago, proveniente de transposones, provenientes de episomas de levadura, proveniente

de elementos de inserción, provenientes de elementos cromosomales de levadura, proveniente de virus tales como vaccinia y otros poxvirus, adenovirus, baculovirus, virus papota, tales como SV40, los virus de viruela de aves, los virus de pseudorabias y retrovirus, alfavirus tales como el virus de la encefalitis equina de Venezuela (Patente U.S. 5,643,576), virus sindbis y virus del bosque semiliki, los virus ARN de hebra negativa no segmentada tales como el virus de la estomatitis vesicular (Patente U.S. 6,168,943), y los vectores derivados de combinaciones de éstos, tales como aquellos derivados de los elementos genéticos de plásmido y bacteriófago, tales como cósmidos y fagémidos. Los sistemas de expresión deben incluir regiones de control que regulan así como también engendran expresión, tales como los promotores y otros elementos reguladores (tales como una señal de poliadenilación). En general, cualquier sistema o vector adecuado para mantener, propagar o expresar los polinucleótidos para producir un polipéptido en un huésped se pueden utilizar. La secuencia de nucleótido apropiada se puede insertar en un sistema de expresión por cualquiera de una variedad de técnicas bien conocidas y de rutina, tales como, por ejemplo, aquellos establecidos en Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" 2nd, ed, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Un vehículo farmacéuticamente aceptable se entiende que designa un compuesto o una combinación de compuestos que ingresan en una composición farmacéutica o inmunogénica que no origina

• nntmg
204

efectos colaterales y que la hace posible, por ejemplo, para facilitar la administración del compuesto activo, para incrementar su vida y/o su eficacia en el cuerpo, para incrementar su solubilidad en solución o alternativamente para mejorar su preservación. Estos vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos y se adaptarán por personas expertas en la técnica de acuerdo a la naturaleza y al modo de administración del compuesto activo escogido.

Como se definen a continuación, un "adyuvante" es una sustancia que sirve para mejorar la inmunogenicidad de un "antígeno" o las composiciones inmunogénicas que comprenden uno o más antígenos de polipéptido que tienen una secuencia de aminoácido seleccionada de uno de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 32. Así, los adyuvantes son a menudo dados para reforzar o modular la respuesta inmune y son bien conocidos por el experto. Ejemplos de adyuvantes contemplados en la presente invención, pero no están limitados a, sales de aluminio (alumbre) tales como fosfato de aluminio e hidróxido de aluminio, *Mycobacterium tuberculosis*, lipopolisacáridos bacterianos, compuestos de fosfato de aminoalquil glucosalina (AGP), o derivados o análogos de éstos, que están disponibles de Corixa (Hamilton, MT) y que se describen en la Patente Estadounidense Número 6,113,918; uno de tales AGP es el 2-[(R)-3-Tetradecanoiloxitetradecanoilamino]etil 2-Desoxi-4-O-fosfono-3-O[(R)-3-tetradecanoioxitetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoioxitetradecanoilamino]-b-D-glucopiranosido, que es también conocido como 529 (antiguamente conocido como RC529), que se formula como una forma acuosa o como una emulsión

nnr 718
205

estable, MPL™ (lípidio A monofosforil 3-O-desacetilado) (Corixa) descrito en la Patente U.S. Número 4,912,094, los polinucleótidos sintéticos tales como oligonucleótidos que contienen el motivo CpG (Patente U.S. Número 6,207,646), los polipéptidos, saponinas tales como Quil A o STIMULON™ QS-21 (Antigenics, Framingham, Massachusetts), descritos en la Patente U.S. Número 5,057,540, una toxina pertussis (PT), o una toxina lábil al calor de *E. coli* (LT), particularmente LT-K63, LT-R72, CT-S109, PT-K9/G129; ver, por ejemplo, las Publicaciones de Patentes Internacionales No. WO 93/13302 y WO 92/19265, la toxina de cólera (en un tipo silvestre o en un forma mutante, por ejemplo, en donde el ácido glutámico en la posición de aminoácido 29 se reemplaza por otro aminoácido, preferiblemente una histidina, de acuerdo con la Solicitud de Patente Internacional publicada número WO 00/18434). Los mutantes de toxina de cólera similares se describen en la Solicitud de Patente Internacional publicada número WO 02/098368 (en donde la isoleusina en la posición de aminoácido 16 se reemplaza por otro aminoácido, bien sea solo o en combinación con el reemplazo de la serina en la posición del aminoácido 68 por otro aminoácido; y/o en donde la valina en la posición de aminoácido 72 se reemplaza por otro aminoácido). Otros mutantes de la toxina del cólera se describen en la Solicitud de Patente Internacional publicada número WO 02/098369 (en donde la arginina en la posición de aminoácido 25 se reemplaza por otro aminoácido; y/o se inserta un aminoácido en la posición del aminoácido 49; y/o dos aminoácidos se insertan en las posiciones del aminoácido 35 y 36).

nnq11
206

Varias citoquinas y linfoquinas son adecuadas para uso como adyuvantes. Uno de tales adyuvantes es el factor estimulante de colonia de granuloso-macrófago (GM-CSF), que tiene una secuencia de nucleótido como se describe en la Patente U.S. Número 5,078,996. Un plásmido que contiene GM-CSF cADN se ha transformado en *E. coli* y se ha depositado con el American Type Culture Collection (ATCC), 1081 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, bajo Número de acceso 39900. La citoquina interleuquina-12 (IL-12) es otro adyuvante que se describe en la Patente U.S. Número 5,723,127. Otras citoquinas o linfoquinas se han mostrado por tener actividad inmuno modulante, que incluye, pero no esta limitada a, las interleuquinas 1-alfa, 1-beta, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 14, 15, 16, 17 y 18, los interferones-alfa, beta y gama, el factor estimulante de colonia de granuloso, y los factores de necrosis tumoral alfa y beta, son adecuados para uso como adyuvantes.

Una composición de la presente invención es típicamente administrada parenteralmente en formulaciones de dosis unitaria que contienen vehículos, adyuvantes, y vehículos fisiológicamente aceptables no tóxicos bien conocidos según se desee.

Las preparaciones inyectables, por ejemplo, los inyectables estériles acuosos y las suspensiones de oleaginosas, se formulan de acuerdo a la técnica conocida utilizando agentes de dispersión o de humectación adecuados, y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución inyectable estéril o una suspensión en un diluyente o solvente

parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol.

nn2+2
207

Entre los vehículos y los solventes aceptables que se pueden emplear están el agua, la solución de Ringer, y la solución de cloruro de sodio isotónica. Además, los aceites estériles, fijados son convencionalmente empleados como un solvente o un medio de suspensión. Para este propósito cualquier aceite fijado blando se puede emplear incluyendo mono o di glicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos tales como el ácido oleico encuentran uso en la preparación de inyectables.

Los vehículos preferidos incluyen soluciones salinas neutras amortiguadas con fosfato, lactato, Tris, y similares. Por supuesto, cuando se administran vectores virales, uno purifica el vector suficientemente para hacerlo esencialmente libre de contaminantes indeseables, tales como partículas de adenovirus interfirientes defectuosas o endotoxinas y otros pirógenos de tal forma que este no origine ningunas reacciones no dirigidas en el individuo que recibe la construcción del vector. Unos medios preferidos para purificar el vector involucran el uso de gradientes de densidad boyante, tales como centrifugación por gradiente de cloruro de cesio.

Un vehículo también puede ser un liposoma. Los medios para utilizar los liposomas como vehículos de suministro son bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Gabizon et al., 1990; Ferruti et al., 1986; y Ranade, 1989).

nn213
202

Las composiciones inmunogénicas de esta invención también comprenden una secuencia de polinucleótido de esta invención operativamente asociada con una secuencia reguladora que controla la expresión del gen. La secuencia de polinucleótido de interés es trabajada por ingeniería en un vector de expresión, tal como un plásmido, bajo el control de los elementos reguladores que promoverán la expresión del ADN, esto es, el promotor y/o los elementos mejoradores. En una modalidad preferida, se utiliza un promotor/mejorador inmediato-temprano de citomegalovirus humano (Patente U.S. 5,168,062). El promotor puede ser un específico de célula y permitir la transcripción sustancial del polinucleótido solamente en células predeterminadas.

Los polinucleótidos de la invención son introducidos directamente en el huésped y como ADN "desnudo" (Patente U.S. 5,580,859) o formuladas en composiciones con agentes facilitadores, tales como bupivacaína y otros anestésicos locales (Patente U.S. 5,593,972) y las poliaminas catiónicas (Patente U.S. 6,127,170), que se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

En este procedimiento de inmunización de polinucleótidos, los polipéptidos de la invención se expresan sobre una base transitoria *in vivo*; ningún material genético se inserta o se integra en los cromosomas del huésped. Este procedimiento debe ser distinguido de la terapia génica, donde la meta es insertar o integrar el material genético de interés en el cromosoma. Un

ensayo se utiliza para confirmar que los polinucleótidos administrados mediante inmunización no den origen a un fenotipo transformado en el huésped (Patente U.S. 6,168,918).

nnn
209

H. Usos y Métodos de la Invención

Los polinucleótidos, polipéptidos y los homólogos de polipéptido de *Staphylococcus epidermidis*, descritos aquí se utilizan en métodos de inmunización. Los polinucleótidos aislados se utilizan para expresar los polipéptidos de *Staphylococcus epidermidis* (por ejemplo, por vía del vector de expresión recombinante en una célula huésped o en aplicaciones de inmunización de polinucleótido).

Como se describió con detalle aquí en los Ejemplos, el *Staphylococcus epidermidis* creció en la presencia de suero para estimular la expresión de proteínas y carbohidratos en la pared celular bacteriana que puede ser significativa para la infección bacteriana sistémica. Como resultado, treinta y dos polipéptidos y los correspondientes polinucleótidos fueron identificados como expresados por *Staphylococcus epidermidis* cuando crecieron en el 70% de suero. Además, veinticuatro de estas proteínas se encontraron que eran reactivas al suero inmune de conejos infectados con *Staphylococcus epidermidis*.

Los genes que corresponden a las proteínas expresadas cuando el *Staphylococcus epidermidis* creció en suero fueron clonados y utilizados para expresar las proteínas recombinantemente. Las

nnn 210

proteínas recombinantes fueron utilizadas para inmunizar ratones y veinticinco de veintiséis proteínas indujeron anticuerpos que reaccionaron con lizados de célula completos de *Staphylococcus epidermidis*. Además, dieciocho de estos sueros también reaccionaron con lizados de célula completa de *Staphylococcus aureus*. Finalmente, cuando los ratones inmunizados fueron inoculados con *Staphylococcus epidermidis* se encontró que once de las proteínas habían inducido anticuerpos que redujeron la cantidad de bacterias detectables encontradas en el vaso después de la inoculación.

La invención suministra además composiciones inmunogénicas que comprenden uno o más polipéptidos ya descritos, los cuales tienen una secuencia de aminoácido seleccionada de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 32, un equivalente biológico de este o un fragmento de este. La composición inmunogénica puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable. En ciertas modalidades, la composición inmunogénica comprenderá uno o más adyuvantes.

En otra modalidad, la invención suministra composiciones inmunogénicas que comprenden un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótido seleccionada de uno de la SEQ ID NO: 33 a la SEQ ID NO: 64, en donde el polinucleótido esta comprendido en un vector de expresión recombinante. Preferiblemente el vector es un ADN plásmido. El polinucleótido puede además comprender nucleótidos heterólogos, por ejemplo, el polinucleótido esta operablemente ligado a uno o más elementos reguladores de

expresión de gen, y además comprende uno o más adyuvantes. En una modalidad preferida, la composición de polinucleótido inmunogénica dirige la expresión de uno o más epítomos neutralizantes del *Staphylococcus epidermidis*. nnqz
217

También se suministran métodos para inmunizar un huésped contra infección de *Staphylococcus epidermidis*. En una modalidad preferida, el huésped es un humano. Así, un huésped o sujeto se le administra una cantidad inmunizante de una composición inmunogénica que comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido seleccionada de una de las SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 32, un equivalente biológico de este o un fragmento de este y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una cantidad inmunizante de una composición inmunogénica se determina al desarrollar un estudio de respuesta a dosis en el cual los sujetos se inmunizan con cantidades gradualmente crecientes de composición inmunogénica y la respuesta inmune analizada para determinar la dosis óptima. Los puntos de partida del estudio son inferidos de los datos de inmunización en modelos animales. La cantidad de dosis puede variar dependiendo de las condiciones específicas de los individuos. La cantidad se determina en ensayos de rutina por medios conocidos por aquellos expertos en la técnica.

Una cantidad inmunológicamente efectiva de la composición inmunogénica en un número apropiado de dosis se administra al sujeto para elicitar una respuesta inmune. La cantidad inmunológicamente efectiva, como se utiliza aquí, significa la administración de esa cantidad a un huésped mamífero

.. 00217

212

(preferiblemente humano), bien sea en una dosis simple o como parte de una serie de dosis, suficiente para al menos originar que el sistema inmune del individuo tratado genere una respuesta que reduzca el impacto clínico de la infección bacteriana. Idealmente, el individuo tratado no exhibirá las manifestaciones clínicas más serias de la infección con los *Staphylococcus epidermidis* o los *Staphylococcus aureus*. La cantidad de dosis puede variar dependiendo de las condiciones específicas de los individuos, tal como la edad y el peso. Esta cantidad se puede determinar en ensayos de rutina por medios conocidos por aquellos expertos en la técnica.

Todas las patentes y publicaciones citadas aquí se incorporan como referencia.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos fueron llevados a cabo utilizando técnicas estándar, las cuales son bien conocidas y la rutina de aquellos expertos en la técnica, excepto donde se describa otra cosa en detalle. Todos los químicos fueron obtenidos de Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) a menos que se establezca otra cosa. Los siguientes ejemplos son presentados con propósitos ilustrativos, y no deben ser considerados de ninguna manera limitantes del alcance de esta invención.

Ejemplo 1

Crecimiento Bacteriano en 70% de Suero

nota
213

Los siguientes ejemplos fueron desarrollados utilizando el aislado clínico *Staphylococcus epidermidis* 0-47. La secuencia genómica no anotada estuvo disponible para este aislado de Incyte Corporation de Palo Alto, CA. Ver Heilmann, C., et al., *Infect Immun*, 64(1): p. 277-82 (1996). Para estimular la expresión de las proteínas, que pueden ser clínicamente relevantes a la patogenicidad, los cultivos de las bacterias fueron crecidos durante toda la noche en un caldo de soya triptico al 100% (TSB) o en suero de conejo: TSB 70: 30 con agitación (200 rpm) a 37°C. El suero de conejo se obtuvo de Life Technologies, Rockville, MD. Las bacterias se diluyeron de un cultivo toda la noche a un OD₆₀₀ ~0.1 y crecidos durante 4h hasta una fase de tronco medio. En la fase de tronco medio, las células se cosecharon mediante centrifugación y procesadas adicionalmente como se describió en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 2

Preparación de las Fracciones de Pared Celular para

Electroforesis de Gel 2-D

Las paredes celulares del *Staphylococcus epidermidis* 0-47 que crecieron como se describió en el Ejemplo 1 fueron aisladas y luego preparadas para electroforesis de gel bidimensional. Los pelmazos bacterianos fueron resuspendidos en un OD₆₀₀ ~20 y lavados dos veces con vasculación durante 15 minutos a 4°C utilizando solución salina amortiguada con Tris (TBS, 20mM de Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl). Las proteínas de suero unidas a la

214

superficie de las bacterias fueron removidas mediante lavado durante 15 minutos a 4°C con 20 mM de Tris, pH 8.0 que contiene NaCl 1M. El crecimiento de las bacterias en TBS se trató de la misma manera que el crecimiento de las bacterias en suero. Las bacterias fueron de nuevo paletizadas mediante centrifugación. Para crear los protoplastos, las bacterias fueron entonces resuspendidas en OD₆₀₀ ~ 40 en TBS que contiene 30% de sucrosa, 100 µg/ml de lisostafin, 10 µg/ml de DNasa, 1 µg/ml de Pefablock (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN), 10 µg/ml de lisozima y 100 unidades/ml de mutanolisina e incubadas a 37°C durante 1 hora. Los protoplastos resultantes fueron paletizados mediante centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante que contiene el material de la pared celular fue decantado. Los sobrenadantes decantados que contienen las fracciones de la pared celular fueron suplementados con tabletas inhibidoras de proteaza Complete Mini (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN) y dializados durante toda la noche contra agua a 4°C utilizando 10,000 kD de membrana de diálisis MWCO (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL). Después de la diálisis, las fracciones de la pared celular fueron congeladas a -20°C.

Luego del aislamiento, las muestras de la fracción de la pared celular fueron preparadas para electroforesis de gel 2-D como sigue: los extractos de la pared celular congelada fueron descongelados y precipitados con 70% de acetona sobre hielo durante 4 horas. El precipitado de proteína fue paletizado, secado en un SpeedVac (Thermo Savant, Holbrook, NY) y solubilizado con ReadyPrep (BioRad) SEQUENTIAL EXTRACTION REAGENT

3, que contiene 5 M de urea, 2 M de tiourea, 2% (p/v) de CHAPS, 2% (p/v) de SB 3-10, 40 mM de Tris y 0.2% de Bio-Lyte 3/10. 215

Las muestras de fracción de la pared celular preparadas fueron cargadas sobre tiras con gradiente de pH inmovilizado de 11 cm (IPG), pH 4-7 (BioRad) al permitirle a cada muestra rehidratar una tira de gel durante una incubación durante toda la noche a temperatura ambiente. El tamaño de la muestra fue de 250 µg en un volumen total de 200 µl. Durante la incubación durante toda la noche, las tiras se cubrieron con aceite mineral (BioRad) para evitar la evaporación. Luego de completar la rehidratación de las tiras, el exceso de aceite mineral se removió sobre papel de secado que se saturó con agua y las tiras hidratadas fueron entonces cargadas en un aparato de enfoque isoelectrico pHaser (IEF) (Genomic Solutions Inc., Ann Arbor, MI). Las tiras fueron pre-enfocadas con un límite de corriente de 50 mA/tira con un voltaje gradualmente creciente de 250 V a 5,000 V. El voltaje se mantuvo entonces constante a 5,000 V durante para un total de 50 kWh (~16h). El SDS-PAGE de segunda dimensión se llevó a cabo utilizando 12.5% geles premoldeados Criterion (BioRad). Para el análisis espectrométrico de masa, los geles fueron teñidos con teñido de gel de proteína Sypro Ruby (BioRad) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se compararon los perfiles del gel bidimensional (2D) de la pared celular asociada con proteínas de *Staphylococcus epidermidis* crecidos en TSB o suero de conejo 70%. Ver Figura 1. El crecimiento en suero de conejo al 70% dio como resultado un

nn~~99~~
216

cambio en el perfil de expresión de la proteína de la pared celular asociada con las proteínas de *Staphylococcus epidermidis* que fue fácilmente detectable en transferencias de teñido fluorescente de geles 2D (Figuras 1^a y 1B).

Fueron detectadas ocho proteínas mediante teñido fluorescente para ser diferencialmente reguladas entre el *Staphylococcus epidermidis* crecido en TSB o en la presencia de suero de conejo. Ver la Tabla 3 y la Figura 1. Lo más notable fue el incremento en el teñido fluorescente de las trazas de tres proteínas entre 25 kDa y 37 kDa en las células crecidas en suero al 70% (Figura 1B, manchas e, g y h).

Tabla 3

Lista de Manchas Identificadas^a

^a Mancha #	Proteína	^c Método de
	SEQ ID NO:	detección
1,2	12	I, S
3	12	I, S
3	19	I, S
4 ^c	11	I, S
4	18	I, S
5-7, 9	11	I, S
8	21	I
10 ^c	11	I, S
10	18	I, S
10	28	I, S
11	3	I, S
12	10	I, S
13	10	I, S
13	26	I, S
14	^d NGID	I, S

nn222
217

15-16	10	I, S
17	25	I
18	4	I
19	17	I, S
19	23	I, S
20-23, 25	17	I, S
24	30	I, S
26	30	I, S
26	8	I, S
26	7	I, S
27, 30-32	2	I, S
28, 33	22	I, S
29	5	I, S
34	13	I, S
35	NGID	I
36	NGID	I
37	NGID	I, S
38	29	I, S
38	3	I, S
39	32	I, S
40	14	S
40	20	S
40	27	S
41	14	S
42	6	I
43	32	S
43	16	S
43	24	S
44	15	S

^aLista de manchas detectadas sobre "blots" 2D mediante reactividad con suero inmune o unión a componentes de suero.

^bAlgunas manchas que contenían más de una proteína.

^cMétodo por el cual la mancha fue detectada luego de la transferencia a nitrocelulosa, suero inmune reactivo

proveniente de conejos infectados, I, o componentes de suero de unión, S.

^dNGID = sin gen en la base de datos.

Ejemplo 3

. 00423

**Unión del Suero Inmune y las Proteínas del Suero Biotinilado a
las Proteínas de la Pared Celular**

118

Después de completar la electroforesis de primera y segunda dimensión, el contenido de la proteína de los geles fue transferido sobre nitrocelulosa para ensayos de unión. Específicamente, el contenido de proteína de los geles fue electro blotteado a membranas de nitrocelulosa (BioRad) utilizando un aparato de bloteo semi-seco (Owl Separations Systems, Portsmouth, NH) a 12V durante 1 hora. La proteína que contiene membranas de nitrocelulosa (blots) fue entonces teñida con tinte de blot proteína Sypro Ruby (BioRad) siguiendo las instrucciones del fabricante y visualizadas en un FluorS Imager (BioRad). Cada blot fue incubado en un amortiguador de bloqueo (PBS con 0.05% de Tween 20 y 5% leche seca) durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego incubado durante toda la noche con una dilución 1:2000 del suero inmune (Western blot) o 40 µg/ml de proteínas de suero biotinilado (ver adelante). Luego de la incubación durante toda la noche, los blots se lavaron 3x con amortiguador de lavado (PBS con 0.5% de Tween 20) e incubado con conjugado de fosfatasa alcalina IgG anti-conejo de cabra (Biosource International, Camarillo, CA) o conjugado de fosfatasa alcalina de estreptavidina (Biosource) durante 2 horas a temperatura ambiente en amortiguador de bloqueo. Los blots fueron de nuevo lavados tres veces con amortiguador de lavado y visualizados con un sistema de sustrato de fosfatasa de membrana BCIP/NBT (KPL, Inc., Gaithersburg, MD). Las fotografías se

tomaron en FluorS. Todos los análisis de los geles 2D se desarrollaron utilizando un software Melanie 3.0.

La concentración de la proteína se ensayó utilizando un kit de ensayo de proteína BioRad (BioRad).

Los cambios en el perfil de expresión de proteína de las proteínas asociadas a la pared celular fue más pronunciada al considerar los Western blots de las membranas de nitrocelulosa que contenían las proteínas transferidas de los geles 2D. En los Western blots, las membranas de nitrocelulosa se incubaron con sueros inmunes agrupados provenientes de conejos repetidamente infectados con *Staphylococcus epidermidis* 0-47. Ver Figuras 1C y 1D. Estas proteínas reguladas positivamente también fueron fuertemente inmunoreactivas, sugiriendo que ellas se expresaron durante la infección de los conejos. Cinco de otras trazas o manchas inmunoreactivas provenientes de las células crecidas en suero se expresaron a niveles más bajos o indetectables en las células crecidas en TSB. Ver Figura 1, manchas a, b, c, d y f.

Ejemplo 4

Análisis de Proteínas de Suero que Interactúan con Proteínas asociadas a la Pared Celular de *Staphylococcus epidermidis*

Elusión de las proteínas de suero provenientes de *Staphylococcus epidermidis*

nn275

220

Staphylococcus epidermidis 0-47 creció en suero de conejo 70% a 37°C a OD₆₀₀ ~0.8 y las células se paletizaron. Las células se resuspendieron en a OD₆₀₀ ~ 20 y lavadas tres veces con TBS aunque pivotando a 4°C. Las proteínas de suero unidas fueron eluidas secuencialmente con 20 mM de Tris, pH 8.0 que contiene NaCl 0.5 M, NaCl 1.0 M o urea 4.0 M durante 1 hora con pivotando a 4°C. Las bacterias fueron entonces removidas mediante centrifugación y recolectado el sobrenadante. Los sobrenadantes contenían las proteínas de suero eluidas de la superficie de las bacterias. Las proteínas eluidas bajo diferentes condiciones se analizaron mediante SDS-PAGE utilizando gradiente 4-20% de geles Tris-glicina (Cambrex Biosciences Rockland, Inc., Rockland, ME).

Biotinilación de proteínas de suero

Las proteínas de suero eluidas fueron dializadas durante toda la noche contra PBS a 4°C. Los IgG fueron reducidos mediante incubación durante toda la noche con proteína G sefarosa (Amersham-Pharmacia, Piscataway, NJ) a 4°C. Asumiendo una masa de proteína promedio de 50 kDa en la fracción eluida, las proteínas se marcaron con un exceso 15 molar de EZ-Link® NHS-biotina (Pierce Biotechnology) durante 1.5 horas a 4°C. La reacción se apagó con exceso de glicina y dializó (10,000 MWCO, Pierce) durante toda la noche contra PBS.

Identificación de las Proteínas de Suero Unidas a la Superficie del *Staphylococcus epidermidis*

21

Las proteínas de suero eluidas de las bacterias bajo estas condiciones se compararon con SDS-PAGE al suero de conejo normal y a las proteínas bacterianas eluidas de la superficie del *Staphylococcus epidermidis* crecido en TSB. Ver Figura 3. Los amortiguadores que contienen 0.5 de NaCl, 1M de NaCl y 4M de urea cada uno eluyeron proteínas de suero unidas provenientes de las células bacterianas. Estas proteínas de suero eluidas representan un grupo de proteínas eluidas de la superficie bacteriana que es enriquecida para las proteínas de suero. Algunas proteínas bacterianas están probablemente presentes en este grupo, sin embargo ninguna proteína bacteriana detectable por el ensayo de proteína fueron eluidas del crecimiento de bacterias en TSB. Aunque algunas bandas de proteína desvanecidas se detectaron mediante tñido con plata para ser eluidas de las bacterias crecidas con el TSB, ellas no correspondieron a las proteínas más intensamente teñidas eluidas de la superficie de las bacterias crecidas en suero. La elusión con NaCl 1M fue la condición menos desnaturalizante que la eluida de la mayoría de las proteínas y se utilizó para eluir las proteínas para los siguientes ejemplos.

Con el fin de identificar las proteínas asociadas a la pared celular involucradas en los componentes de suero de unión, las proteínas de suero marcadas con biotina se utilizaron para sondear transferencias 2D al incubar una solución de las proteínas marcadas con proteínas de la pared celular unidas a nitrocelulosa transferidas de un gel 2D. Para aislar las proteínas de suero que se unen al *Staphylococcus epidermidis*, las bacterias crecidas en 70% de suero de conejo se lavaron con 1M de

NaCl. Las proteínas de suero eluidas se recolectaron y se dializaron en PBS. Luego, el IgG inmune de ocurrencia natural que puede estar presente en las proteínas de suero eluidas se vaciaron mediante incubación con proteína G sefarosa. La remoción del IgG reduce la probabilidad de identificar una proteína que es reactiva con anticuerpos huésped. Las proteínas de suero eluidas fueron entonces marcadas con biotina como se describió anteriormente y se utilizaron para sondear un blot 2D de proteínas de superficie celular de *Staphylococcus epidermidis*. Ver Fig 4A y 4B. Treinta y cuatro manchas y regiones fueron visualizadas mediante este método y están probablemente involucradas en la interacción de *Staphylococcus epidermidis* con las proteínas de suero huésped. De las 34 manchas consistentemente encontradas para interactuar con los componentes de suero todas sino 4 se encontraron que reaccionan con el suero inmune proveniente de conejos infectados. Ver Fig 2 y Tabla 3.

El crecimiento de *Staphylococcus epidermidis* en suero tuvo proteínas de suero unidas a las proteínas de la superficie bacteriana que fueron eluidas con 0.5M y 1M de NaCl. Bajo las mismas condiciones pocas proteínas de *Staphylococcus* fueron eluidas provenientes del crecimiento de bacterias en TSB sin embargo es posible que la proteína de *Staphylococcus* se expresaron solamente en suero se eluyan mediante un tratamiento con alto en sal.

nmr78
223

Ejemplo 5
Identificación de Espectroscopia de Masa de Proteínas Reguladas
Positivamente de Suero

Crecimiento bacteriano en 70% de suero se utilizó en experimentos y análisis proteómicos subsecuentes, trabajando bajo la presunción de que los cambios detectados durante el crecimiento en el suero pueden reflejar más precisamente las alteraciones en la expresión del gen hecho por medio de la bacteria en respuesta a situaciones ambientales vistas dentro de un huésped. En los siguientes estudios de espectroscopia de masa, las proteínas aisladas provenientes de manchas sobre separaciones de electroforesis de gel 2D se sometieron primero a espectroscopia de masa tiempo de vuelo. Si se obtuvo una identificación positiva, no ambigua, entonces no se requiere desarrollar un análisis espectrométrico de masa adicional. Ver Tabla 4. En el caso donde subsista alguna ambigüedad después de la espectroscopia de masa de tiempo de vuelo, tal como cuando proteínas múltiples resolvieron la misma mancha sobre el gel 2D, entonces la espectroscopia de masa de electropulverizado se desarrolló para resolver la ambigüedad. Ver Tabla 4.

Tabla 4
Proteínas Identificadas mediante Espectroscopia de Masa

	Proteína	ADN	Gel 2-D
Orf	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	Número de Mancha
121	1	33	38
305	2	34	27, 30-32

nn279

721

321	3	35	11
373	4	36	18
554	5	37	29
639	6	38	42
608	7	39	26,
702	8	40	26
793	9	41	39
847	10	42	12, 13, 15, 16
854	11	43	4, 5-7, 9, 10
1015	12	44	1, 2, 3
1069	13	45	34
1238	14	46	40, 41
1382	15	47	44
1405	16	48	43
1450	17	49	19, 20-23, 25
1522	18	50	4, 10
1545	19	51	3
1653	20	52	40,
1690	21	53	8
1703	22	54	28, 33
2006	23	55	19
2180	24	56	43
2214	25	57	17
2482	26	58	13
2580	27	59	40
2649	28	60	10
2653	29	61	38
2736	30	62	24, 26
2907	31	63	
2975	32	64	39, 43

Preparación de la Muestra

Antes de desarrollar la espectroscopia de masa, las manchas de proteína blanco se sometieron a una digestión triptica en gel.

Las manchas de proteína se removieron del gel y se cortaron en piezas de ~1mm. Las piezas de gel se lavaron tres veces con 0.2 ml de 50% (v/v) de acetonitrilo (Burdick & Jackson, Muskegon, MI) en 10mM de bicarbonato de amonio (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) durante 15 minutos con agitación ocasional. Las piezas de gel se deshidrataron con acetonitrilo durante 5 minutos, liofilizadas, y almacenadas congeladas a -20°C. Las proteínas en el gel fueron entonces digeridas con 50 µl de 12 ng/ml de tripsina modificada grado de secuenciación (Promega Corporation, Madison, WI) durante toda la noche a 37°C. La solución de tripsina fue entonces removida y el gel de nuevo deshidratado en 50 µl de acetonitrilo. El acetonitrilo que contiene péptido fue entonces removido y las piezas de gel lavadas en 50 µl de ácido fórmico al 5% (Riedel-de Haën, Seelze, Alemania) durante 15 minutos a temperatura ambiente en un sonicador de baño (Branson Cleaning Equipment Co., Shelton, CT). El sobrenadante que contiene el péptido se removió y se combinó con el lavado de acetonitrilo inicial. El gel fue de nuevo lavado en acetonitrilo y el sobrenadante combinado con dos etapas de extracción previas y secadas en un SpeedVac (Thermo Savant) a ~10 µl, luego diluidas a 100 µl con 0.1% (v/v) de ácido fórmico acuoso. La muestra fue entonces cargada sobre una columna P10 Zip-Tip_{C18} (Waters Corporation, Milford, MA) y eluida en 50 µl de acetonitrilo 50%/ácido fórmico 0.1%. Las muestras fueron transferidas a una placa de acero inoxidable recubierta con Teflón con 96 X 2 pozos (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA) para el análisis de huella digital de masa sobre el instrumento MALDI-ToF (Biosystems PerSeptive) puntas de nanopulverizado de

vidrio (New Objective Inc., Woburn, MA) para ser pulverizadas en el orificio del espectrómetro de masa con trampa de ión.

nnnq1

76

Huella Digital de Masa de Péptido Utilizando la Espectrometría de Masa ToF

Cada muestra se aplicó a la placa, de 96 X 2 pozos de acero inoxidable, recubierta con Teflón con aplicación de una capa delgada de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico. Las muestras se les permitieron secarse a temperatura ambiente. Los datos espectrales de masa se adquirieron sobre un espectrómetro de masa Voyager DE-STR MALDI-ToF (PerSeptive Biosystems) equipado con tecnología de extracción retrasada, y un reflector. El espectrómetro de masa estaba equipado con un láser de nitrógeno a 337 nm y un índice de láser de 3 Hz. El voltaje de aceleración se ajustó a 20 kV, el modo de operación (reflector), el modo de extracción (retrasado), polaridad (positiva), voltaje de grilla (65%), índice de voltaje de espejo (1.12), tiempo de retraso de extracción (200 nseg), índice de masa (800-3500 Da), y disparos de láser por espectro (200).

Espectroscopia de Masa con Trampa de Ión Nanopulverizado Estático

Los datos espectrales de masa se adquirieron sobre un espectrómetro de masa con trampa de ión cuádruple ThermoFinnigan LCQ DECA (ThermoFinnigan, San José, CA) equipado con una interfase de nano-electropulverizado. La interfase de nano-electropulverizado consistía de una aguja de pulverizado de

. 00332
727

sílice, ~27 mm de longitud por 120/69 μm de OD/ID, diámetro de orificio 2 μm (New Objective Inc.). La punta del vidrio se montó sobre un soporte con eje x, y, z (ThermoFinnigan) sostenidos sobre una base ubicada en el frente del detector del espectrómetro de masa. Se aplicó corriente eléctrica al recubrimiento estándar de la punta de vidrio para suministrar una conexión eléctrica para la interfase de electropulverizado a través de una conexión de metal sobre la sonda de nanopulverizado estática (ThermoFinnigan). El nanopulverizado suministró un flujo de 20-80 nl/min.

Dos a cinco microlitros del digerido triptico se analizaron utilizando una punta de vidrio de nanopulverizado dirigida hacia el orificio del espectrómetro de masa. Los análisis de péptido fueron conducidos sobre el espectrómetro de masa con trampa de ión LCQ-DECA (Thermofinnigan) que opera a un voltaje de pulverizado variable de ~1 kV, y utilizando una temperatura capilar calentada de 200°C. Los datos ajustados fueron adquiridos en un modo MS/MS automatizado utilizando un software de adquisición de datos suministrado con el instrumento. El método de adquisición incluyó una exploración de 1 MS (400-1800 m/z) seguido por exploración MS/MS de los tres iones más abundantes superiores en la exploración MS. La función de exclusión dinámica se empleo para incrementar el número de iones de péptido que se analizaron (configuraciones: 3 amu = ancho de exclusión, 0.5 minutos = duración de exclusión). El experimento corriente se analizó en grupos de muestras y en forma manual.

El análisis automatizado de los datos de la huella digital de masa se desarrolló utilizando MSFIT (Protein Prospector) y motores de búsqueda con una base de datos software MASCOT (Matrix Science) utilizando una base de datos Incyte PathoSeq(c) *Staphylococcus epidermidis* 0-47. Los espectros resultantes se procesaron con corrección de la línea base, remoción de ruido, y el pico "de-isotoping" antes de utilizar los motores de búsqueda. Los parámetros de búsqueda de la base de datos se ajustaron en los siguientes niveles: MW (1000 - 150 kDa), pI (3-10), Digestión (tripsina), número max. de clivajes perdidos (2), pfactor de clivajes perdidos (0.4), modificación estática (cisteína modificada mediante acrilamida), Terminal N (hidrógeno), Terminal C (ácido libre), mods variable (oxidación de metionina, acetilación N-terminal, fosforilación de serina, treonina, y tirosina), masa (monoisotópica), número mínimo de péptidos requerido para coincidencia (4) con una tolerancia de masa de 300 ppm, y la aplicación de la calibración iterativa (Intelcast) con una tolerancia de masa de 15 ppm.

Las identificaciones de proteína se determinaron mediante una calificación MOWSE y una calificación de 95% de confianza mediante MS-FIT y MASCOT respectivamente.

Los análisis automatizados de los datos MS/MS se desarrollaron utilizando SEQUEST incorporated en el paquete de análisis de datos Finnigan Bioworks (ThermoFinnigan). Ver Eng, J.K., et al., J Amer Soc Mass Spec, 5(11): p. 976-89 (1994). Las siguientes modificaciones variables se permitieron en el

software: modificación de cisteína acrilamida y oxidación de metionina. Los parámetros de búsqueda se ajustaron en las siguientes designaciones: rango de masa (400-3500 Da), señal MS de intensidad inferior ($1e^{-5}$), tolerancia de péptido (2.0 Da), número min. de iones fragmento (15), número min. de exploraciones en un grupo (1), y número máximo de clivajes perdidos (2). Todas las identificaciones de proteína se verificaron manualmente para precisión.

Identificación de Proteínas mediante Espectrometría de Masa.

Las manchas se detectaron consistentemente en ambas transferencias fluorescente e inmunoteñido del crecimiento de *Staphylococcus epidermidis* en 70% de suero, fueron calculadas y marcadas para identificación mediante espectroscopia de masa. Ver Figuras 2A y 2B. Un total de 40 manchas inmunoreactivas se cortaron y se sometieron a análisis espectrométrico de masa para identificación. Ver Tabla 4. Las secuencias de proteína completas se muestran en la lista de secuencia (SEQ ID NO:1-32). Las manchas de gel que contienen proteína se cortaron de un gel e identificadas mediante un análisis de huella digital de masa utilizando MALDI-ToF seguido por la búsqueda de una base de datos Incyte PathSeq(c) *Staphylococcus epidermidis* 0-47 para la correspondiente región codificante. Ver Tabla 4. Las manchas con golpes de proteína múltiple o señales cuestionables se analizaron adicionalmente utilizando un nanopulverizado estático. Un total de 32 proteínas se identificaron, conteniendo algunas manchas más de una proteína. Ver las Tablas 3 y 4. Veinticuatro de las

nnnn
236

proteínas identificadas fueron inmunoreactivas, y 26 unidas a componentes de suero y 20 de las proteínas fueron ambas inmunoreactivas y unidas a suero. Este largo traslapo fue esperado, en razón a que la mayoría de las proteínas sobre la superficie del *Staphylococcus epidermidis* involucradas en la unión a los factores de suero elicitarían probablemente una respuesta inmune.

Seis proteínas estuvieron consistentemente presentes en las manchas de inmunoteñido, pero ninguna de las manchas correspondientes estaba visiblemente presente sobre las transferencias de teñido fluorescente. Ver Figura 2B, círculos blancos y flecha. Aunque estas proteínas fueron probablemente expresadas durante una infección y elicitaron una respuesta inmune ellas no se expresan en niveles que permiten su detección mediante teñido de proteína fluorescente bajo las condiciones utilizadas en estos experimentos.

Ejemplo 6

Predicción de la Función de la Proteína

La función predicha de las proteínas se determinó por comparación con los homólogos del genoma completo del ATCC12228. Ver Zhang, Y.Q., et al., Mol Microbiol, 49(6), p. 1577-93 (2003). Las funciones predichas mostradas en la Tabla 5, se atribuyen a los ORF respectivos por las publicaciones anteriores que involucran la proteína específica o por la homología a las

proteínas previamente caracterizadas que ocurren en otros organismos.

nn 231

Tabla 5

Funciones Predichas de las proteínas de S. epidermidis

Mancha #	Función Predicha	Proteína	Método de detección
		SEQ ID NO:	
1,2	dihidrolipoamida deshidrogenasa	12	I, S
3	"	12	I, S
	glutamato-1-semialdehído 2,1-aminomutasa	19	I, S
4	enolasa	11	I, S
	Factor de elongación TU (EF-TU)	18	I, S
5-7, 9	enolasa	11	I, S
8	Fosfogluconato deshidrogenasa	21	I
10	enolasa	11	I, S
	Factor de elongación TU (EF-TU)	18	I, S
	Na ⁺ /H ⁺ antiportero	28	I, S
11	alanina deshidrogenada	3	I, S
12	gliceraldehído-3-fosfato deshidro (GAPDH)	10	I, S
13	"	"	I, S
	Factor de elongación (EF-TS)	26	I, S
14	No coincide		I, S
15-16	gliceraldehído-3-fosfato deshidro (GAPDH)	10	I, S
17	acetil-CoA C-acetiltransferasa	25	I
18	cistationina gama-sintasa	4	I
19	lipoproteína que une ferricromo	17	I, S
	oligopéptido permeasa	23	I, S
20-23, 25	lipoproteína que une ferricromo	17	I, S
24	fructosa-bifosfato aldolasa	30	I, S

nn 3-7
232

26	"	"	I, S
	Proteína hipotética	8	I, S
	Proteína hipotética	7	I, S
27, 30-32	Lipoproteína (SitC)	2	I, S
28, 33	Lipoproteína que une aminoácido	22	I, S
29	Hexulosa-6-fosfato sintasa putativa	5	I, S
34	Lipoato ligasa	13	I, S
35	no coincide		I
36	no coincide		I
37	no coincide		I, S
38	Antígeno inmunodominante A	29	I, S
	Proteína putativa	1	I, S
39	Proteína que une matriz extracelular (Embp)	32	I, S
40	Cisteína sintasa	14	S
	Homólogo de Fructosa-bifosfato aldolasa	20	S
	Tioredoxina reductazo	27	S
41	Cisteína sintasa	14	S
42	Transaldolasa putativa	6	I
43	Proteína que une matriz extracelular (Embp)	32	S
	Transquetolasa	16	S
	Proteína hipotética	24	S
44	Subunidad de glutamil-tARN ^{Gln} amidotransferasa	15	S

*La función predicha de las proteínas se determinó por comparación con los homólogos del genoma completo del ATCC12228.

^bMétodo mediante el cual la mancha se detectó luego de la transferencia a nitrocelulosa, suero inmune reactivo proveniente de conejos infectados, I, o componentes de suero de unión, S.

Como se discutió anteriormente, el perfil de expresión de las proteínas asociadas a la pared celular de *Staphylococcus*

epidermidis 0-47 crecidas en suero de conejo al 70% se analizaron mediante electroforesis de gel 2D. El perfil de la expresión total en el suero se determinó por ser significativamente diferente de aquel que ocurre luego del crecimiento en TSB. Numerosas proteínas que fueron reguladas positivamente durante el crecimiento en suero se identificaron mediante espectroscopia de masa y sus funciones predichas mediante comparación de secuencia. Ver Tabla 5. Las tres proteínas predichas por estar involucradas en la adquisición de nutriente, 305, 1450, y 1703 se incrementaron significativamente. Ver Tablas 4 y 5. Todas las tres proteínas forman vetas a través del gel. Ver Figura 4. Sin querer estar ligado por la teoría, esto puede ser la consecuencia de isómeros de carga múltiple, o relacionados a su composición de lipoproteína predicha. Adicionalmente, todas las tres proteínas son altamente reactivas con inmunosuero proveniente de conejos infectados con *Staphylococcus epidermidis* 0-47 que sugieren que estas proteínas también son expresadas en el huésped durante una infección. Ver Figura 2 y Tabla 5. En total, 24 de estas proteínas se identificaron como reactivas con suero inmune proveniente de conejos infectados. No solamente son estas proteínas expresadas durante el crecimiento en el suero, sino que ellas también elicitaban una respuesta inmune en un animal infectado. Ver Ejemplo 8. Tomados juntos, estos datos sugieren que estos antígenos son todos expresados durante una infección. La expresión de los transcritos provenientes de estos ORF dentro del torrente sanguíneo de un ratón infectado se confirmó mediante RT-PCR para todas las proteínas identificadas (datos no mostrados).

Ejemplo 7

Clonación y Expresión de Proteínas Recombinantes

Los genes fueron clonados utilizando iniciadores diseñados con base en las proteínas identificadas mediante espectrometría de masa de las proteínas expresadas y de la base de datos de *Staphylococcus epidermidis* 0-47. Los genes individuales se amplificaron mediante reacción de cadena de polimerasa (PCR) utilizando polimerasa Pfu Turbo ADN (Stratagene, La Jolla, CA) y los sobrecolgantes de adenina se agregaron con una polimerasa Taq ADN (Roche Diagnostics). Los productos de reacción fueron clonados en pCRT7/NT-TOPO o pBAD/TOPOThio (Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante y transformadas en *E. coli* Top10 (Invitrogen). Los clones positivos se detectaron mediante PCR de colonia utilizando el mastermix ReddyMix PCR (ABgene, Rochester, NY) y secuenciadas para asegurar que no surgieran mutaciones espurias. Los plásmidos provenientes de los clones pCRT7 se purificaron y transformaron en *E. coli* BL21 (DE3) (Invitrogen) para expresión utilizando la polimerasa T7. Las proteínas se expresaron mediante crecimiento de los clones positivos en caldo de HySoy (1% HySoy, Queso Intl, Stockbridge, GA), 0.5% de extracto de levadura, 100 mM de NaCl, 50 mM de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 40 mM de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) suplementado con 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina a 37°C con agitación (200 rpm) hasta $\text{OD}_{600} \sim 1.0$. La expresión de la proteína se indujo con 1 mM IPTG (pCRT7) o 0.2% de arabinosa (pBAD) y los cultivos crecieron unas 3 horas adicionales. Las células fueron luego cosechadas mediante

centrifugación y la expresión se evaluó mediante SDS-PAGE de lisados de célula completa.

nn
255

Purificación de las Proteínas Recombinantes

Los glóbulos de célula fueron suspendidos en 100 ml de TBS (20 mM Tris, pH 8.0, 150 mM de NaCl) y lisados mediante un pasado a través de una célula de presión Francesa (SLM-Aminco, Rochester, NY). Las muestras fueron entonces separadas en una fracción soluble o en un glóbulo insoluble mediante centrifugación a 10,000 x g durante 10 minutos. La localización de proteína recombinante se evaluó mediante SDS-PAGE. Si una proteína recombinante estaba en una fracción soluble, entonces la proteína se cargó en la resina de agarosa de ácido iminodiacético cargada con Ni ²⁺. Ver Tabla 6. Luego, la columna se lavó con 30 mM de imidazol en TBS. Las proteínas unidas se eluyeron con 300 mM de imidazol en TBS. Si se requería una etapa de purificación adicional, las proteínas se dializaron en 20 mM de Tris, pH 8.0, que contiene 50 mM de NaCl, 1 mM de EDTA y cargadas sobre una columna empacada con resina POROS-Q (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las proteínas unidas se eluyeron con un gradiente de 50 mM a 500 mM de NaCl en 20 mM de Tris, pH 8.0, 1 mM de EDTA. Las fracciones que contienen la proteína de interés se determinaron mediante SDS-PAGE y se congelaron a -20°C.

Si se encontró una proteína recombinante en la fracción insoluble, entonces la fracción insoluble se trató con 100 ml de

nn944
236

Tritón X-100 1% en TBS durante 4 horas a 4°C. Ver Tabla 6. Las proteínas insolubles se paletizaron mediante centrifugación y el sobrenadante se descartó. El glóbulo insoluble se extrajo luego con 100 ml de urea 8 M en TBS durante al menos 8 horas a temperatura ambiente. Los desechos insolubles se peletizaron y la proteína se purificó como anteriormente excepto que todos los amortiguadores contenían urea 2M. Luego de la purificación el Tritón X-100 se agregó a la concentración final de 0.1%. Las proteínas fueron entonces dializadas en TBS que contiene el 0.1% de Tritón y almacenadas a -20°C.

Se desarrolló cromatografía líquida utilizando un explorador AKTA (Amersham-Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Todos los SDS-PAGE fueron desarrollados utilizando un gradiente 4-20% de geles de Tris-glicina (Cambrex).

Tabla 6
Solubilidad de la Proteína Recombinante

rf	Proteína	Localización de la Proteína Recombinante	
	SEQ ID NO:	Fracción Soluble	Fracción Insoluble
121	1		X
305	2	X	
321	3		X
373	4		X
554	5	X	
639	6	X	
608	7		X
702	8		X
793	9		X

nn 2-2
237

847	10	X	
854	11		X
1015	12		X
1069	13		X
1238	14		X
1382	15		X
1405	16		X
1450	17	X	
1522	18		X
1545	19		X
1653	20		X
1690	21	X	
1703	22	X	
2006	23	NT	
2180	24		X
2214	25		X
2482	26	X	
2580	27	X	
2649	28		X
2653	29	X	
2736	30		X
2907	31	NT	
2975	32	NT	

X indica que la proteína se encontró en esa fracción. NT indica no ensayado.

Ejemplo 8

**Composiciones Inmunogénicas que Utilizan Proteínas de
Staphylococcus epidermidis Recombinantes**

Ratón es Balb/C hembra de cuatro semanas (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) se inmunizaron a las 0,3 y 6 semanas con 10 µg de proteína recombinante formulada con 20 µg de STIMULON™ QS-21 mediante inyección subcutánea. Los ratones fueron sangrados a la semana 0 antes de la primera inmunización y

nn 13
250
a la semana 8. Dos días luego del sangrado final, los ratones fueron inoculados mediante inyección intraperitoneal de 5×10^8 cfu de *Staphylococcus epidermidis* 0-47 que crecieron durante toda la noche en una agar de sal Columbia (agar Columbia 1x, 0.1% de glucosa, 1% de extracto de levadura, 0.5% de NaCl). Veinticuatro horas luego de la inoculación, los ratones se sacrificaron y las bacterias se enumeraron en el vaso y en la sangre.

Immunización Activa de ratones con proteínas recombinantes

Veintisiete orfs que codifican las proteínas que se unen a suero o las inmunoreactivas fueron clonadas del *Staphylococcus epidermidis* 0-47 y las proteínas recombinantes se expresaron en *E. coli* con una etiqueta de hexahistidina (la etiqueta His se utilizó como un asunto de conveniencia; una composición inmunogénica de esta invención contendría proteínas expresadas en la etiqueta His). Ver Tabla 7. Estas proteínas fueron purificadas utilizando una columna de quelato de Ni seguida por una cromatografía de intercambio de ión. Los tres orf clonados restantes (2006, 2975 y 2907) se clonaron pero no se expresaron a niveles suficientes para purificación. Los ratones Balb/C se inmunizaron a las 0,3 y 6 semanas con proteínas recombinantes individuales. Los animales fueron sangrados en las semanas 0 y 8 e inoculados (i.p.) a la semana 8 con *Staphylococcus epidermidis* 0-47. Veinticuatro horas luego de la inoculación, los animales fueron sometidos a eutanasia y el número de bacterias presentes se enumeraron en la sangre y en el vaso. Esta selección inicial de los candidatos a composición inmunogénica se desarrollaron en

00244

239

grupos de 5 animales para posibilitar la selección de las numerosas proteínas. Los datos resultantes no son estadísticamente significativos pero ellos suministran información valiosa del potencial de la composición inmunogénica de un gran número de candidatos. Ocho de las veintisiete proteínas recombinantes redujeron el número de bacterias recuperadas del vaso y/o la sangre por un log o más. Ver Tabla 7 (NT = no ensayado).

Tabla 7

Reducción en Conteos Bacterianos Luego de la Inmunización

Orf	Proteína	Reducción de log CFU	
	SEQ ID NO:	Bazo	Sangre
121	1	NT	NT
305	2	0.8	1
321	3	0	1
373	4	0	0
554	5	0.5	0
639	6	0	0
608	7	0.5	0
702	8	0	0
793	9	NT	NT
847	10	0	0
854	11	1.5	0.7
1015	12	0	0
1069	13	1.1	0
1238	14	1	0.8
1382	15	0	0
1405	16	0	0
1450	17	0	0
1522	18	0	0

00245

240

1545	19	0	0
1653	20	1	0
1690	21	0	0
1703	22	2	0
2006	23	NT	NT
2180	24	0	0
2214	25	1.2	0.9
2482	26	0	0
2580	27	0	0
2649	28	0.9	0
2653	29	0	0
2736	30	0	0
2907	31	NT	NT
2975	32	NT	NT

NT indica no ensayado.

El suero obtenido de los ratones inmunizados se evaluó para la reactividad del anticuerpo a las proteínas bacterianas. Ver Tabla 8. Veintitrés o veinticuatro sueros inmunes ensayados reaccionaron con las proteínas nativas, determinadas mediante los western blots de los lisados de célula completos de *Staphylococcus epidermidis* que crecieron a la fase log media en suero de conejo. Ver Tabla 8 (NT = no ensayado)

Tabla 8

Reactividad de Anticuerpo a Proteína de *Staphylococcus*

Orf	Proteína SEQ ID NO:	Reactividad de Anticuerpo a Proteína de <i>Staphylococcus</i>	
		<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>
121	1	NT	NT
305	2	+	+

247

321	3	+	-
373	4	+	NT
554	5	-	NT
639	6	+	-
608	7	+	+
702	8	+	+
793	9	+	+
847	10	+	+
854	11	+	
1015	12	+	+
1069	13	+	+
1238	14	+	NT
1382	15	+	+
1405	16	+	+
1450	17	+	+
1522	18	+	+
1545	19	+	+
1653	20	+	NT
1690	21	+	+
1703	22	+	+
2006	23	NT	NT
2180	24	NT	NT
2214	25	+	+
2482	26	+	+
2580	27	+	NT
2649	28	+	+
2653	29	-	NT
2736	30	+	+
2907	31	NT	NT
2975	32	NT	NT

NT indica no ensayado.

Como se muestra en la Tabla 8, muchos de los animales inmunizados con antígenos de *Staphylococcus epidermidis* también desarrollaron respuestas a anticuerpos a *Staphylococcus aureus*.

nn 327

242

Por lo tanto, las composiciones inmunogénicas contra los antígenos de *Staphylococcus epidermidis* podrían ser efectivas en el tratamiento o prevención de *Staphylococcus aureus* así como también *Staphylococcus epidermidis*. Ver Tabla 8.

Un subconjunto de las proteínas recombinantes utilizadas en las composiciones inmunogénicas anteriores, fueron utilizadas para inmunizar grandes grupos de ratones. Los grupos de 10 ratones Balb/C hembras (4 semanas de edad) se inmunizaron mediante inyección subcutánea con solución salina o 10 µg de antígeno con 20 µg de STIMULON™ QS-21 como adyuvante. Dos semanas luego de la última inmunización, los ratones se inocularon con $\sim 5 \times 10^8$ cfu de *S. epidermidis* 0-47 mediante inyección intraperitoneal. Veinticuatro horas después de la inoculación, las bacterias se enumeraron en la sangre y el vaso. Ver Tabla 9. La reducción en el log CFU se determinó comparada con un control de STIMULON™ QS-21 en solución salina. Los datos se analizaron mediante el ensayo T de student con valores p de *0.05 o **0.01.

Tabla 9

Proteínas Utilizadas en Composiciones Inmunogénicas

Orf	REDUCCIÓN DE LOG CFU	
	Bazo	Sangre
305	0.5	
321	0.7	1.2*
554	--	
608	0.3	
793	0.7	

nn248

243

854	0.9	
1069	1.6**	
1238	1.2*	1.2*
1653	0.4	
1703	0.8	
2214	1.4*	
2649	1.2*	

*p-valor < 0.05

**p-valor < 0.01

Las proteínas de *Staphylococcus epidermidis* mostradas en la Tabla 9 mostraron la más grande efectividad cuando se utilizaron en composiciones inmunogénicas que redujeron la severidad de una infección bacteriana luego de una inoculación subsecuente.

Ejemplo 9

Protección de la Inoculación con *Staphylococcus aureus* luego de la Inmunización con Proteínas de *Staphylococcus epidermidis*

Como se sugirió mediante los datos de unión del anticuerpo en el ejemplo 8, (Tabla 8), las composiciones inmunogénicas contra los antígenos de *Staphylococcus epidermidis* podrían ser efectivas en el tratamiento o prevención de *Staphylococcus aureus*. Por lo tanto, se desarrolló una inoculación utilizando *Staphylococcus aureus* luego de la inmunización con composiciones inmunogénicas de antígenos de *Staphylococcus epidermidis*.

Ratones CD-1 hembra de cuatro semanas de edad (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) se inmunizaron a las 0,3 y 6 semanas con 10 µg de proteína recombinante en 20 µg de STIMULON™

QS-21 mediante inyección subcutánea. Los ratones fueron sangrados en la semana 0 antes de la primera inmunización y a la semana 8. Dos días luego del sangrado final los ratones fueron inoculados mediante inyección intraperitoneal de 3×10^8 cfu de *S. aureus* Reynolds crecido durante toda la noche en un agar de sal Columbia (agar Columbia 1x, 0.1% glucosa, 1% extracto de levadura, 0.5% de NaCl). Veinticuatro horas luego de la inoculación, los ratones se sacrificaron y las bacterias se enumeraron en el riñón.

Tabla 10

Inoculación con *Staphylococcus aureus*

	Proteína	Función	Reducción
ORF	SEQ ID NO:	Predicha	CFU
2653	29	inmunodominante Ag A	0.9 log
321	3	alanina deshidrogenasa	0.7 log
1015	12	dihidrolipoamida deshidrogenasa	ninguno
608	7	desconocido	0.6 log
1069	13	lipoato ligasa	1.7 log
639	6	hipotético	ninguno

Como se muestra en la Tabla 10, ciertos antígenos de *Staphylococcus epidermidis* fueron efectivos en inducir anticuerpos que reconocieron y se unieron a *Staphylococcus aureus*. Además, los anticuerpos inducidos tenían el efecto benéfico de reducir el nivel de bacterias enumeradas después de una inoculación con *Staphylococcus aureus*.

La identidad porcentual de la secuencia de aminoácido de los antígenos de polipéptido de *Staphylococcus epidermidis* de la SEQ ID NO:1 a SEQ ID NO:32 se compararon con la secuencia de aminoácido de sus homólogos provenientes de *Staphylococcus aureus*. Los resultados se muestran en la Tabla 11.

nn 245

Tabla 11

Identidad entre *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus*

Orf	Polipéptido SEQ ID NO:	% Identidad con Homólogo en <i>S. aureus</i>
121	1	33%
305	2	76%
321	3	85%
373	4	81%
554	5	87%
639	6	62%
608	7	89%
702	8	97%
793	9	23%
847	10	95%
854	11	94%
1015	12	96%
1069	13	82%
1238	14	94%
1382	15	93%
1405	16	82%
1450	17	71%
1522	18	96%
1545	19	91%
1653	20	95%
1690	21	89%

1703	22	82%
2006	23	90%
2180	24	87%
2214	25	73%
2482	26	91%
2580	27	91%
2649	28	78%
2653	29	62%
2736	30	92%
2907	31	
2975	32	32%

nnrrr
246

La homología se determinó entre las secuencias de polipéptido

REIVINDICACIONES:

nn 252 247

LO QUE SE REIVINDICA ES:

1. Una composición inmunogénica que comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido seleccionada de una o más de las SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 32, un equivalente biológico de este, o un fragmento de este.
2. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en donde el polipéptido es inmunoreactivo con los anticuerpos en el suero de conejos infectados con *Staphylococcus epidermidis*.
3. La composición inmunogénica de la reivindicación 1 o 2, en donde el polipéptido se une a una o más de las proteínas de suero de conejo.
4. La composición inmunogénica de acuerdo a una cualquiera o más de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.
5. La composición inmunogénica de acuerdo a una cualquiera o más de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende adicionalmente uno o más adyuvantes.
6. La composición inmunogénica de acuerdo a una cualquiera o más de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el polipéptido se deriva de *Staphylococcus epidermidis*.

nn243

248

7. La composición inmunogénica de acuerdo a una cualquiera o más de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el polipéptido comprende adicionalmente aminoácidos heterólogos.
8. La composición inmunogénica de acuerdo a una cualquiera o más de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el polipéptido es un polipéptido de fusión.
9. La composición inmunogénica de acuerdo a una cualquiera o más de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el polipéptido es un polipéptido recombinante.
10. La composición inmunogénica de acuerdo a una cualquiera o más de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el polipéptido se aísla de *Staphylococcus epidermidis*.
11. La composición inmunogénica de acuerdo a una cualquiera o más de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el polipéptido comprende un epitopo neutralizante de *Staphylococcus epidermidis*.
12. La composición inmunogénica de acuerdo a una cualquiera o más de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el polipéptido es una lipoproteína.
13. La composición inmunogénica de acuerdo a una cualquiera o más de las reivindicaciones 1 a 12, dicha composición

comprende adicionalmente un antígeno de polisacárido de *Staphylococcus epidermidis*.

14. La composición inmunogénica de acuerdo a una cualquiera o más de las reivindicaciones 1 a 13, dicha composición comprende adicionalmente un polisacárido o antígeno de polipéptido de *Staphylococcus aureus*.
15. La composición inmunogénica de acuerdo a una cualquiera o más de las reivindicaciones 1 a 14, en donde el polipéptido comprende una secuencia de polipéptido de *Staphylococcus epidermidis* seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, y SEQ ID NO: 30, un equivalente biológico de este, o un fragmento de este.
16. La composición inmunogénica de acuerdo a una cualquiera o más de las reivindicaciones 1 a 15, en donde el polipéptido se codifica por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótido que tiene al menos aproximadamente 95% de identidad con una secuencia de nucleótido seleccionada de una de las SEQ ID NO: 33 a la SEQ ID NO: 64 o una variante degenerada de éstos, o un fragmento de éstos.
17. La composición inmunogénica de acuerdo a una cualquiera o más de las reivindicaciones 1 a 16, en donde el polinucleótido se deriva de *Staphylococcus epidermidis*.

AC
nn 35

18. La composición inmunogénica de acuerdo a una cualquiera o más de las reivindicaciones 1 a 17, en donde la secuencia de polinucleótido de *Staphylococcus epidermidis* se selecciona del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, y SEQ ID NO: 62, o una variante degenerada de este, o un fragmento de este.
19. La composición inmunogénica de acuerdo a una cualquiera o más de las reivindicaciones 1 a 18, en donde el polinucleótido comprende adicionalmente nucleótidos heterólogos.
20. Una composición inmunogénica que comprende un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada de una de la SEQ ID NO: 33 a la SEQ ID NO: 64, una variante degenerada de éstos, o un fragmento de éstos y esta comprendida en un vector de expresión.
21. La composición inmunogénica de la reivindicación 20, en donde la secuencia de polinucleótido de *Staphylococcus epidermidis* se selecciona del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, y SEQ ID NO: 62, o una variante degenerada de este, o un fragmento de este.

251

nn 156

22. La composición inmunogénica de la reivindicación 20 o 21, en donde el vector es un ADN de plásmido.
23. La composición inmunogénica de acuerdo a una cualquiera o más de las reivindicaciones 20 a 22, en donde el polinucleótido es un polinucleótido recombinante.
24. La composición inmunogénica de acuerdo a una cualquiera o más de las reivindicaciones 20 a 23, en donde el polinucleótido se deriva de *Staphylococcus epidermidis*.
25. La composición inmunogénica de la reivindicación 24, en donde el polinucleótido comprende nucleótidos heterólogos.
26. La composición inmunogénica de acuerdo a una cualquiera o más de las reivindicaciones 20 a 23, en donde el polinucleótido esta operativamente ligado a uno o más elementos reguladores de expresión de gen.
27. La composición inmunogénica de la reivindicación 24, en donde el polinucleótido dirige la expresión de un epítipo neutralizante de *Staphylococcus epidermidis*.
28. La composición inmunogénica de acuerdo a una cualquiera o más de las reivindicaciones 20 a 23, que comprende adicionalmente un agente que facilita la transfección.

.29. La composición inmunogénica de la reivindicación 28, en donde dicho agente que facilita la transfección es bupivacaína.

30. Un método para inducir una respuesta inmune contra *Staphylococcus epidermidis* que comprende administrar a un mamífero una cantidad inmunogénica de una composición que comprende: un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido seleccionada de uno o más de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 32 o un equivalente biológico de este, o un fragmento de este, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

31. El método de la reivindicación 30, en donde el polipéptido comprende adicionalmente aminoácidos heterólogos.

32. El método de la reivindicación 31, en donde el polipéptido es un polipéptido de fusión.

33. El método de la reivindicación 30, que comprende adicionalmente un adyuvante.

34. El método de la reivindicación 30 o 31, en donde el polipéptido es un polipéptido recombinante.

35. Un método para inducir una respuesta inmune contra *Staphylococcus epidermidis* que comprende administrar a un mamífero una cantidad inmunogénica de una composición que

comprende: un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótido seleccionada de uno o más de la SEQ ID NO: 33 a la SEQ ID NO: 64, una variante degenerada de este, un fragmento de este y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

nnq-8
253

36. El método de la reivindicación 35, que comprende adicionalmente un vector.

37. El método de la reivindicación 35, en donde el vector es un ADN de plásmido.

38. El método de la reivindicación 35, en donde el polinucleótido es un polinucleótido recombinante.

39. El método de la reivindicación 35, en donde el polinucleótido comprende adicionalmente nucleótidos heterólogos.

40. El método de la reivindicación 35, en donde el polinucleótido esta operativamente ligado a uno o más de los elementos reguladores de expresión de gen.

41. El método de la reivindicación 35, que comprende adicionalmente un adyuvante.

42. El método de la reivindicación 35, en donde dicha composición comprende adicionalmente un agente facilitador de transfección.

nn 779
294

43. El método de la reivindicación 42, en donde dicho agente facilitador de transfección es bupivacaína.
44. Un método para inducir una respuesta inmune contra *Staphylococcus aureus* que comprende administrar a un mamífero una cantidad inmunogénica de una composición que comprende: una secuencia de polipéptido de *Staphylococcus epidermidis* seleccionado del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, y SEQ ID NO: 30, un equivalente biológico de este, o un fragmento de este.
45. Un método para inducir una respuesta inmune contra *Staphylococcus aureus* que comprende administrar a un mamífero una cantidad inmunogénica de una composición que comprende: una secuencia de polinucleótido de *Staphylococcus epidermidis* seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, y SEQ ID NO: 62, o una variante degenerada de este, o un fragmento de este.
46. Un método para la detección y/o identificación de *Staphylococcus epidermidis* en una muestra biológica que comprende:

nnacg

(a) poner en contacto la muestra con una sonda de oligonucleótido de un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótido seleccionada de una de la SEQ ID NO: 33 a la SEQ ID NO: 64, o una variante degenerada de este, o un fragmento de este, bajo condiciones que permitan la hibridización; y

(b) detectar la presencia de complejos de hibridización en la muestra, en donde los complejos de hibridización indican la presencia de *Staphylococcus epidermidis* en la muestra.

47. Un método para la detección y/o identificación de anticuerpos para *Staphylococcus epidermidis* en una muestra biológica que comprende:

(a) poner en contacto la muestra con una polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada de una de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 32, o un equivalente biológico de éstos, o un fragmento de éstos, bajo las condiciones que permitan la formación de complejos inmunes; y

(b) detectar la presencia de complejos inmunes en la muestra, en donde los complejos inmunes indican la presencia de *Staphylococcus epidermidis* en la muestra.

nn294

256

48. Una composición de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29 para uso en un método para inducir una respuesta inmune contra *Staphylococcus epidermidis*.

RESUMEN

nn 242

25

La presente invención se relaciona con composiciones inmunogénicas, que comprenden polipéptidos aislados de *Staphylococcus epidermidis*. La invención también se relaciona con polinucleótidos que codifican los polipéptidos de *Staphylococcus epidermidis* y su uso en composiciones inmunogénicas. Además, la invención se relaciona con métodos para inducir una respuesta inmune en mamíferos contra *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* que utilizan composiciones inmunogénicas de los polipéptidos y polinucleótidos de *Staphylococcus epidermidis*. La invención también se relaciona con los métodos para detectar *Staphylococcus epidermidis* en una muestra biológica.

nn 375
258

Fig. 1

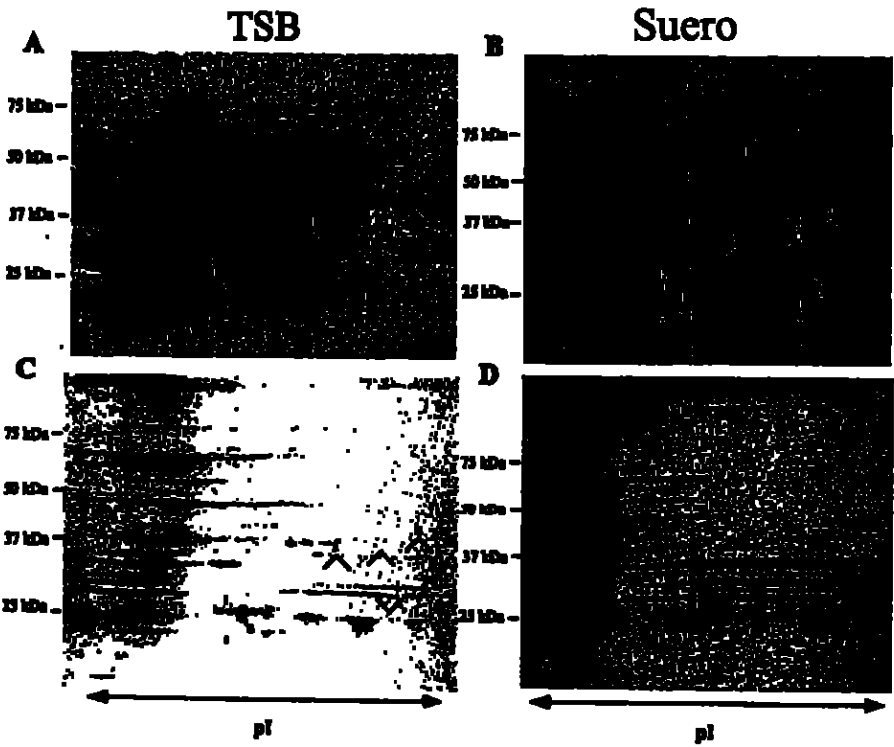


FIGURA 1

nn+
239

Fig. 2

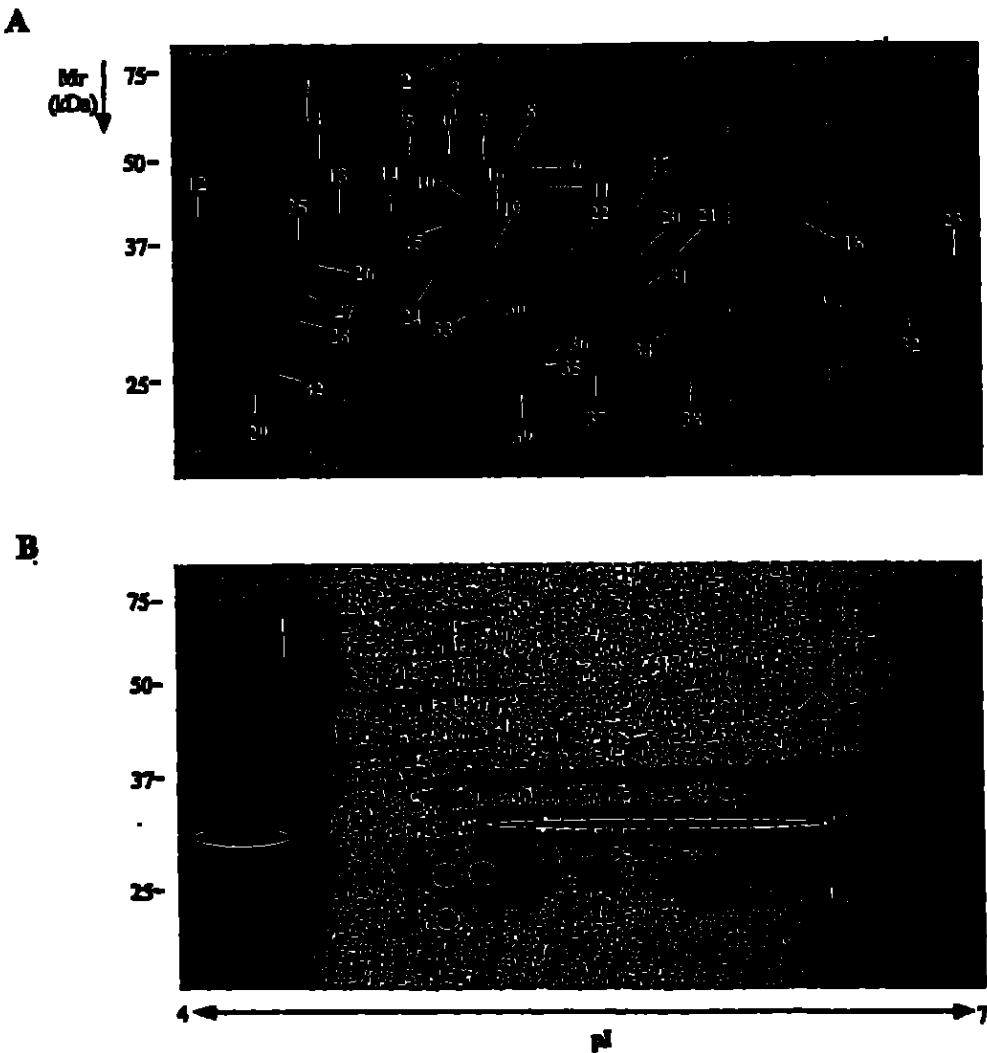


FIGURA 2

Fig. 3

nn245
260

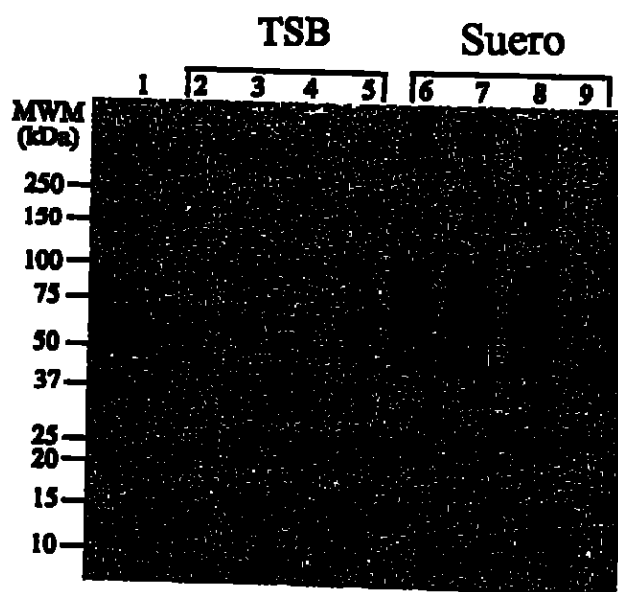


FIGURA 3

nn 246
269

Fig. 4

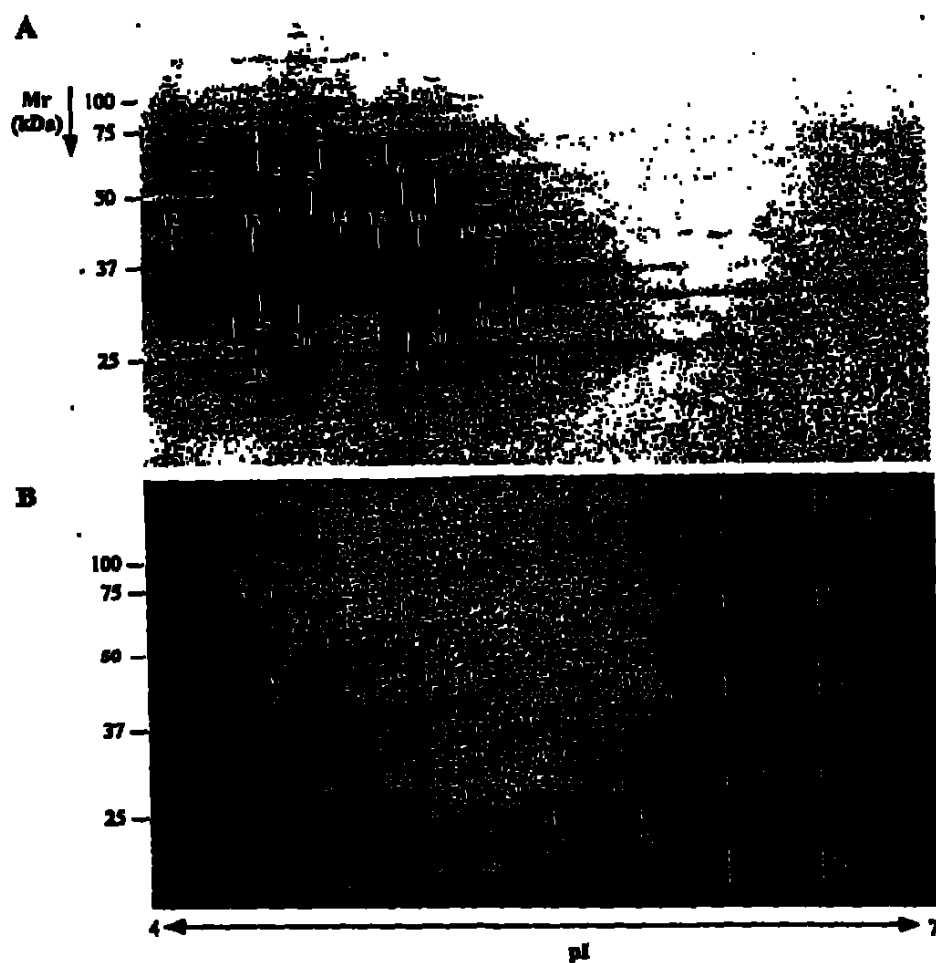


FIGURA 4

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION []

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de 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 []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de 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 []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable

Fecha 19-04-07

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: Info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

263

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Folio 421

2020
Bogotá D.C.,

Doctor(a)
CORREA ORDOÑEZ ALVARO
Apoderado(a) y/o Representante de
WYETH

REFERENCIA	Radicación No.	07 39070
	Solicitud internacional	PCT/US2005/037746
	Fecha inicio fase nacional	21/05/2007
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	416
	Oficio No.	2994
	Folios	1

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC,

04 JUN. 2007

ALIX CARMENZA CRESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

adpa11

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

RECEIVED

FONTENOT, J., Darrell
Wyeth
Patent Law Department
Five Giralda Farms
Madison, NJ 07940
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

FEB 23 2007

Date of mailing (day/month/year)

06 February 2007 (06.02.2007)

Applicant's or agent's file reference

AM101548

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.

PCT/US2005/037746

International filing date (day/month/year)

19 October 2005 (19.10.2005)

International publication date (day/month/year)

04 January 2007 (04.01.2007)

Priority date (day/month/year)

21 October 2004 (21.10.2004)

Applicant

WYETH et al

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).

2. (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

3. (If applicable) An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date

Priority application No.

Country or regional Office
or PCT receiving OfficeDate of receipt
of priority document

21 October 2004 (21.10.2004)

60/620,768

US

13 October 2006 (13.10.2006)

RECEIVED

MAR 19 2007

RECEIVED

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Winnifred A. Ventura

Yoshiko Kuwahara
SHEILA MCGRINE

Retiro folio

368, 369 y 370

Excocto y Tojelo
