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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
26 April 2018 (26.04.2018)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number
WO 2018/072031 A1

(51) International Patent Classification:
C07K 14/31 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
A61K 39/085 (2006.01) *C12N 15/31* (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01) *C12N 15/62* (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/CA2017/051253

(22) International Filing Date:
20 October 2017 (20.10.2017)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
62/411,120 21 October 2016 (21.10.2016) US

(71) Applicant: **SOCPRA SCIENCES ET GÉNIES S.E.C.** [CA/CA]; Pavillon Irénée-Pinard, B6-3012, 2500, boul. de l'Université, Sherbrooke, Québec J1K 2R1 (CA).

(72) Inventors: **MALOUIN, François**; 235 chemin d'Orford-sur-le-Lac, Eastman, Québec J0E 1P0 (CA). **STER, Céline**; 142 Chemin de Cookshire, Compton, Québec J0B 1L0 (CA). **CÔTÉ-GRAVEL, Julie**; 1091, rue Fairmount, app. #2, Sherbrooke, Québec J1H 3N6 (CA). **BROUILLETTE, Éric**; 1143, rue de Forillon, Sherbrooke, Québec J1N 4K9 (CA).

(74) Agent: **GOUDREAU GAGE DUBUC**; 2000, avenue McGill College, #2200, Montréal, Québec H3A 3H3 (CA).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO,

(54) Title: VACCINE CONSTRUCTS AND USES THEREOF AGAINST STAPHYLOCOCCUS INFECTIONS

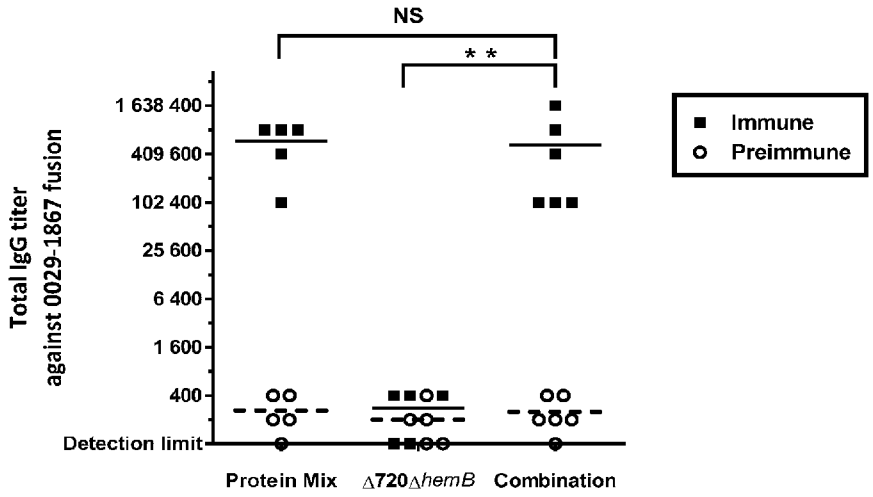


FIG. 16

(57) Abstract: There is provided a fusion construct of formula (I): X-A-linker-B-Z (I) wherein : (1) A and B are identical or different and are independently: (a) a polypeptide comprising a SACOL0029 polypeptide as set forth in any one of the sequences depicted in FIG. 24 (SEQ ID NOs: 5 and 121 to 131), a SACOL0264 polypeptide (SEQ ID NO : 185), a SACOL0442 polypeptide as set forth in any one of the sequences depicted in FIG. 22D (SEQ ID NOs: 29 and 82 to 92), a SACOL0718 polypeptide (SEQ ID NO : 186), a SACOL0720 polypeptide as set forth in any one of the sequences depicted in FIGs. 23I-J (SEQ ID NOs: 11 and 109 to 120), a SACOL1353 polypeptide (SEQ ID NO : 187), a SACOL1416 polypeptide (SEQ ID NO : 188), a SACOL1611 polypeptide (SEQ ID NO : 189), a SACOL1867 polypeptide as set forth in any one of the sequences depicted in FIG. 25D (SEQ ID NOs: 152 to 164), a SACOL1912 polypeptide (SEQ ID NO : 43), a SACOL1944 polypeptide (SEQ ID NO : 190), a SACOL2144 polypeptide (SEQ ID NO : 191), a SACOL2365 polypeptide (SEQ ID NO : 192), a SACOL2385 polypeptide (SEQ ID NO : 50) or a SACOL2599 polypeptide (SEQ ID NO : 193), based on the gene nomenclature from the Staphylococcus aureus COL (SACOL) genome set forth in

WO 2018/072031 A1

[Continued on next page]

DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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

Published:
— *with international search report (Art. 21(3))*
— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

NCBI Reference Sequence NC_002951.2; (b) a polypeptide encoded by a gene from a same operon as a gene encoding the polypeptide of (a); (c) a polypeptide comprising an immunogenic fragment of at least 13 consecutive amino acids of (a) or (b); (d) a polypeptide comprising an amino acid sequence at least 60% identical overall to the sequence of the polypeptide of any one of (a) to (c); or (e) a polypeptide comprising an immunogenic variant comprising at least 13 consecutive amino acids of any one of (a) to (c); (2) the linker is an amino acid sequence of at least one amino acid or is absent; (3) X is absent or is an amino acid sequence of at least one amino acid; and (4) Z is absent or is an amino acid sequence of at least one amino acid. Also provided are compositions and kits comprising the fusion and uses of these fusions, compositions and kits.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SOCPRA SCIENCES ET GENIE S.E.C.
MALOUIN, FRANCOIS
STER, CELINE
COTE-GRAVEL, JULIE
BROUILLETTE, ERIC

<120> CONSTRUCTOS DE VACUNA Y SUS USOS CONTRA INFECCIONES CAUSADAS POR STAPHYLOCOCCUS

<130> 193 481 m2/m14/mfe

<140>
<141> 21 de mayo de 2019

<150> 62/411.120
<151> 21-10-2016

<160> 196

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 15
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 1

Lys Asp Gly Gly Lys Tyr Thr Leu Glu Ser His Lys Glu Leu Gln
1 5 10 15

<210> 2
<211> 40
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 2

Gly Glu His Leu Pro Lys Gly Asn Ile Val Ile Asn Thr Lys Asp Gly
1 5 10 15

Gly Lys Tyr Thr Leu Glu Ser His Lys Glu Leu Gln Lys Asp Arg Glu
20 25 30

Asn Val Lys Ile Asn Thr Ala Asp
35 40

<210> 3

<211> 48
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

<400> 3

Lys Asp Gly Gly Lys Tyr Thr Leu Glu Ser His Lys Glu Leu Gln Glu
1 5 10 15

Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Lys Asp Ile Asn Lys Ile Tyr
20 25 30

Phe Met Thr Asp Val Asp Leu Gly Gly Pro Thr Phe Val Leu Asn Asp
35 40 45

<210> 4
<211> 168
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 4
atgctagaat ctagagagca attatcagtc gaagaatacg aaacattctt taacagattt
60

gataatcaag aatttgattt cgaacgtgaa ttgacacaag atccatattc aaaagtatac
120

ttatacagta tagaagacca tatcagaaca tataagatag agaaataa
168

<210> 5
<211> 55
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 5

Met Leu Glu Ser Arg Glu Gln Leu Ser Val Glu Glu Tyr Glu Thr Phe
1 5 10 15

Phe Asn Arg Phe Asp Asn Gln Glu Phe Asp Phe Glu Arg Glu Leu Thr
20 25 30

Gln Asp Pro Tyr Ser Lys Val Tyr Leu Tyr Ser Ile Glu Asp His Ile
35 40 45

Arg Thr Tyr Lys Ile Glu Lys
50 55

<210> 6
<211> 165
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 6
ctagaatcta gagagcaatt atcagtcgaa gaatacgaaa cattctttaa cagatttgat
60

aatcaagaat ttgatttcga acgtgaattg acacaagatc catattcaaa agtatactta
120

tacagtatag aagaccatat cagaacatat aagatagaga aataa
165

<210> 7
<211> 54
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 7

Leu Glu Ser Arg Glu Gln Leu Ser Val Glu Glu Tyr Glu Thr Phe Phe
1 5 10 15

Asn Arg Phe Asp Asn Gln Glu Phe Asp Phe Glu Arg Glu Leu Thr Gln
20 25 30

Asp Pro Tyr Ser Lys Val Tyr Leu Tyr Ser Ile Glu Asp His Ile Arg
35 40 45

Thr Tyr Lys Ile Glu Lys
50

<210> 8
<211> 61
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

<400> 8

Met His His His His His His Leu Glu Ser Arg Glu Gln Leu Ser Val
1 5 10 15

Glu Glu Tyr Glu Thr Phe Phe Asn Arg Phe Asp Asn Gln Glu Phe Asp
20 25 30

Phe Glu Arg Glu Leu Thr Gln Asp Pro Tyr Ser Lys Val Tyr Leu Tyr
35 40 45

Ser Ile Glu Asp His Ile Arg Thr Tyr Lys Ile Glu Lys
50 55 60

<210> 9
<211> 66
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

<400> 9

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser Leu Glu Ser Arg
1 5 10 15

Glu Gln Leu Ser Val Glu Glu Tyr Glu Thr Phe Phe Asn Arg Phe Asp
20 25 30

Asn Gln Glu Phe Asp Phe Glu Arg Glu Leu Thr Gln Asp Pro Tyr Ser
35 40 45

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

Glu Lys
65

<210> 10
<211> 1889
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 10

atgaccttta acgagataat atttaaaaat ttccgtcaaa atttatcaca ttatgccatc
60

tatctttttt cgttaattac gagtgtagta ttgtatttta gctttgtagc attaaaatac
120

gctcataaac taaacatgac agagtcatat ccaattataa aggaaggctc acaagtcgga
180

agctactttc tatttttcat cataattgca tttttgttat atgccaatgt gttatttatt
240

aaacgacgaa gttatgagct tgcattatat caaacattag gtttatctaa attcaacatt
300

atttatatac taatgctcga acaattacta atatttataa ttacggcaat attaggtatt
360

attattggta tttttggttc gaaactgtta ttaatgattg tctttacatt attaggaatt
420

aaagaaaagg ttccaattat ttttagtttg agggcggtat ttgaaacatt aatgttaatc
480

ggtgtcgctt atttttaac atctgctcaa aattttatat tagtgttcaa acaatctatt
540

tcacagatgt caaagaataa ccaggttaaa gaaacaaatc ataataaaat tacatttgaa
600

gaggttgttt taggcatctt aggtatagta ttgattacca caggatacta tctatctttg
660

aacattgttc aatattatga ttctatcggt acacttatgt ttattttatt gtcaactgtg
720

attggggcat acttatttt taaaagctct gtttctctag tttttaaaat ggtgaagaag
780

tttagaaaag gtgttataag tgtaaatgat gtcatgttct catcatctat tatgtatcgt
840

attaagaaaa atgctttttc acttacggtc atggcaatca tttcagcgat tactgtttca
900

gttctttgct ttgctgctat aagtagagcg tccttatcaa gtgaaataaa atatactgca
960

ccacacgacg ttacaattaa agaccaacaa aaagctaatc aattagcaag tgaattaaac
1020

aatcaaaaaa ttcctcattt ttataattat aaagaagtaa ttcatacgaa attgtataaa
1080

gataatttat ttgatgtaaa agcgaaagaa ccatacaatg taacaattac tagtgataaa
1140

tacatcccta atactgattt gaaacgtggg caagctgatt tatttgtagc ggaaggttct
1200

atcaaagatt tagtgaaaca taagaagcat ggtaaggcaa ttataggaac gaaaaaacat
1260

catgttaata ttaagttacg taaagatatt aataaaatct attttatgac agatgttgat
1320

ttaggtggac caacgtttgt cttaaatgac aaagactatc aagaaataag aaagtataca
1380

aaggcaaagc atatcgtctc tcaatttgga ttcgatttga aacataaaaa agatgcttta
1440

gcattagaaa aagcgaaaaa taaagttgat aaatctattg aaacaagaag tgaagcgata
1500

agctcaatat caagtttaac cggaatatta ttatttgtaa catcattttt aggtattaca
1560

ttcttgattg ctgtatgttg cattatatac ataaagcaaa tagatgaaac cgaagatgag
1620

ttagagaatt atagtatttt gagaaagctt ggatttacac aaaaagatat ggcaagggga
1680

ctaaagttta aaattatgtt taattttggg ttacctttag ttattgcact atcacatgca
1740

tattttacat cattagcata tatgaaatta atgggtacaa cgaatcaaat accggttttc
1800

atagtaatgg gattatacat ttgtatgtat gctgtttttg cagtgacggc ttataatcat
1860

tccaagcgaa cattagacat tccatataa
1889

<210> 11
<211> 629
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 11

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

```
His Tyr Ala Ile Tyr Leu Phe Ser Leu Ile Thr Ser Val Val Leu Tyr
            20                  25                  30

Phe Ser Phe Val Ala Leu Lys Tyr Ala His Lys Leu Asn Met Thr Glu
        35                  40                  45

Ser Tyr Pro Ile Ile Lys Glu Gly Ser Gln Val Gly Ser Tyr Phe Leu
    50                  55                  60

Phe Phe Ile Ile Ile Ala Phe Leu Leu Tyr Ala Asn Val Leu Phe Ile
65                  70                  75                  80

Lys Arg Arg Ser Tyr Glu Leu Ala Leu Tyr Gln Thr Leu Gly Leu Ser
                85                  90                  95

Lys Phe Asn Ile Ile Tyr Ile Leu Met Leu Glu Gln Leu Leu Ile Phe
            100                 105                 110

Ile Ile Thr Ala Ile Leu Gly Ile Ile Ile Gly Ile Phe Gly Ser Lys
        115                 120                 125

Leu Leu Leu Met Ile Val Phe Thr Leu Leu Gly Ile Lys Glu Lys Val
    130                 135                 140

Pro Ile Ile Phe Ser Leu Arg Ala Val Phe Glu Thr Leu Met Leu Ile
145                 150                 155                 160

Gly Val Ala Tyr Phe Leu Thr Ser Ala Gln Asn Phe Ile Leu Val Phe
                165                 170                 175

Lys Gln Ser Ile Ser Gln Met Ser Lys Asn Asn Gln Val Lys Glu Thr
            180                 185                 190

Asn His Asn Lys Ile Thr Phe Glu Glu Val Val Leu Gly Ile Leu Gly
        195                 200                 205

Ile Val Leu Ile Thr Thr Gly Tyr Tyr Leu Ser Leu Asn Ile Val Gln
    210                 215                 220

Tyr Tyr Asp Ser Ile Gly Thr Leu Met Phe Ile Leu Leu Ser Thr Val
225                 230                 235                 240
```

```
Ile Gly Ala Tyr Leu Phe Phe Lys Ser Ser Val Ser Leu Val Phe Lys
                245                 250                 255

Met Val Lys Lys Phe Arg Lys Gly Val Ile Ser Val Asn Asp Val Met
            260                 265                 270

Phe Ser Ser Ser Ile Met Tyr Arg Ile Lys Lys Asn Ala Phe Ser Leu
        275                 280                 285

Thr Val Met Ala Ile Ile Ser Ala Ile Thr Val Ser Val Leu Cys Phe
    290                 295                 300

Ala Ala Ile Ser Arg Ala Ser Leu Ser Ser Glu Ile Lys Tyr Thr Ala
305                 310                 315                 320

Pro His Asp Val Thr Ile Lys Asp Gln Gln Lys Ala Asn Gln Leu Ala
                325                 330                 335

Ser Glu Leu Asn Asn Gln Lys Ile Pro His Phe Tyr Asn Tyr Lys Glu
            340                 345                 350

Val Ile His Thr Lys Leu Tyr Lys Asp Asn Leu Phe Asp Val Lys Ala
        355                 360                 365

Lys Glu Pro Tyr Asn Val Thr Ile Thr Ser Asp Lys Tyr Ile Pro Asn
    370                 375                 380

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

Ile Lys Asp Leu Val Lys His Lys Lys His Gly Lys Ala Ile Ile Gly
                405                 410                 415

Thr Lys Lys His His Val Asn Ile Lys Leu Arg Lys Asp Ile Asn Lys
            420                 425                 430

Ile Tyr Phe Met Thr Asp Val Asp Leu Gly Gly Pro Thr Phe Val Leu
        435                 440                 445
```

```
Asn Asp Lys Asp Tyr Gln Glu Ile Arg Lys Tyr Thr Lys Ala Lys His
    450                 455                 460

Ile Val Ser Gln Phe Gly Phe Asp Leu Lys His Lys Lys Asp Ala Leu
465                 470                 475                 480

Ala Leu Glu Lys Ala Lys Asn Lys Val Asp Lys Ser Ile Glu Thr Arg
                485                 490                 495

Ser Glu Ala Ile Ser Ser Ile Ser Ser Leu Thr Gly Ile Leu Leu Phe
            500                 505                 510

Val Thr Ser Phe Leu Gly Ile Thr Phe Leu Ile Ala Val Cys Cys Ile
        515                 520                 525

Ile Tyr Ile Lys Gln Ile Asp Glu Thr Glu Asp Glu Leu Glu Asn Tyr
    530                 535                 540

Ser Ile Leu Arg Lys Leu Gly Phe Thr Gln Lys Asp Met Ala Arg Gly
545                 550                 555                 560

Leu Lys Phe Lys Ile Met Phe Asn Phe Gly Leu Pro Leu Val Ile Ala
                565                 570                 575

Leu Ser His Ala Tyr Phe Thr Ser Leu Ala Tyr Met Lys Leu Met Gly
            580                 585                 590

Thr Thr Asn Gln Ile Pro Val Phe Ile Val Met Gly Leu Tyr Ile Cys
        595                 600                 605

Met Tyr Ala Val Phe Ala Val Thr Ala Tyr Asn His Ser Lys Arg Thr
    610                 615                 620

Ile Arg His Ser Ile
625
```

<210> 12
<211> 200
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 12

```
Arg Ala Ser Leu Ser Ser Glu Ile Lys Tyr Thr Ala Pro His Asp Val
1               5                  10                  15

Thr Ile Lys Asp Gln Gln Lys Ala Asn Gln Leu Ala Ser Glu Leu Asn
            20                  25                  30

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

Lys Leu Tyr Lys Asp Asn Leu Phe Asp Val Lys Ala Lys Glu Pro Tyr
    50                  55                  60

Asn Val Thr Ile Thr Ser Asp Lys Tyr Ile Pro Asn Thr Asp Leu Lys
65                  70                  75                  80

Arg Gly Gln Ala Asp Leu Phe Val Ala Glu Gly Ser Ile Lys Asp Leu
                85                  90                  95

Val Lys His Lys Lys His Gly Lys Ala Ile Ile Gly Thr Lys Lys His
            100                 105                 110

His Val Asn Ile Lys Leu Arg Lys Asp Ile Asn Lys Ile Tyr Phe Met
        115                 120                 125

Thr Asp Val Asp Leu Gly Gly Pro Thr Phe Val Leu Asn Asp Lys Asp
    130                 135                 140

Tyr Gln Glu Ile Arg Lys Tyr Thr Lys Ala Lys His Ile Val Ser Gln
145                 150                 155                 160

Phe Gly Phe Asp Leu Lys His Lys Lys Asp Ala Leu Ala Leu Glu Lys
                165                 170                 175

Ala Lys Asn Lys Val Asp Lys Ser Ile Glu Thr Arg Ser Glu Ala Ile
            180                 185                 190

Ser Ser Ile Ser Ser Leu Thr Gly
        195                 200
```

<210> 13

<211> 199
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 13

```
Ala Ser Leu Ser Ser Glu Ile Lys Tyr Thr Ala Pro His Asp Val Thr
1               5                  10                  15

Ile Lys Asp Gln Gln Lys Ala Asn Gln Leu Ala Ser Glu Leu Asn Asn
            20                  25                  30

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

Leu Tyr Lys Asp Asn Leu Phe Asp Val Lys Ala Lys Glu Pro Tyr Asn
    50                  55                  60

Val Thr Ile Thr Ser Asp Lys Tyr Ile Pro Asn Thr Asp Leu Lys Arg
65                  70                  75                  80

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

Lys His Lys Lys His Gly Lys Ala Ile Ile Gly Thr Lys Lys His His
            100                 105                 110

Val Asn Ile Lys Leu Arg Lys Asp Ile Asn Lys Ile Tyr Phe Met Thr
        115                 120                 125

Asp Val Asp Leu Gly Gly Pro Thr Phe Val Leu Asn Asp Lys Asp Tyr
    130                 135                 140

Gln Glu Ile Arg Lys Tyr Thr Lys Ala Lys His Ile Val Ser Gln Phe
145                 150                 155                 160

Gly Phe Asp Leu Lys His Lys Lys Asp Ala Leu Ala Leu Glu Lys Ala
                165                 170                 175

Lys Asn Lys Val Asp Lys Ser Ile Glu Thr Arg Ser Glu Ala Ile Ser
            180                 185                 190
```

Ser Ile Ser Ser Leu Thr Gly
195

<210> 14
<211> 146
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 14

Ala Ser Leu Ser Ser Glu Ile Lys Tyr Thr Ala Pro His Asp Val Thr
1 5 10 15

Ile Lys Asp Gln Gln Lys Ala Asn Gln Leu Ala Ser Glu Leu Asn Asn
20 25 30

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

Leu Tyr Lys Asp Asn Leu Phe Asp Val Lys Ala Lys Glu Pro Tyr Asn
50 55 60

Val Thr Ile Thr Ser Asp Lys Tyr Ile Pro Asn Thr Asp Leu Lys Arg
65 70 75 80

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

Lys His Lys Lys His Gly Lys Ala Ile Ile Gly Thr Lys Lys His His
100 105 110

Val Asn Ile Lys Leu Arg Lys Asp Ile Asn Lys Ile Tyr Phe Met Thr
115 120 125

Asp Val Asp Leu Gly Gly Pro Thr Phe Val Leu Asn Asp Lys Asp Tyr
130 135 140

Gln Glu
145

<210> 15
<211> 54
<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 15

Lys Asp Ile Asn Lys Ile Tyr Phe Met Thr Asp Val Asp Leu Gly Gly
1 5 10 15

Pro Thr Phe Val Leu Asn Asp Lys Asp Tyr Gln Glu Ile Arg Lys Tyr
20 25 30

Thr Lys Ala Lys His Ile Val Ser Gln Phe Gly Phe Asp Leu Lys His
35 40 45

Lys Lys Asp Ala Leu Ala
50

<210> 16
<211> 25
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 16

Lys Asp Ile Asn Lys Ile Tyr Phe Met Thr Asp Val Asp Leu Gly Gly
1 5 10 15

Pro Thr Phe Val Leu Asn Asp Lys Asp
20 25

<210> 17
<211> 26
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 17

Lys Asp Ile Asn Lys Ile Tyr Phe Met Thr Asp Val Asp Leu Gly Gly
1 5 10 15

Pro Thr Phe Val Leu Asn Asp Lys Asp Tyr
20 25

<210> 18
<211> 15
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 18

Ser Gln Phe Gly Phe Asp Leu Lys His Lys Lys Asp Ala Leu Ala
1 5 10 15

<210> 19
<211> 23
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 19

Lys Asp Ile Asn Lys Ile Tyr Phe Met Thr Asp Val Asp Leu Gly Gly
1 5 10 15

Pro Thr Phe Val Leu Asn Asp
20

<210> 20
<211> 19
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 20

Lys His Ile Val Ser Gln Phe Gly Phe Asp Leu Lys His Lys Lys Asp
1 5 10 15

Ala Leu Ala

<210> 21
<211> 14
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 21

Gln Phe Gly Phe Asp Leu Lys His Lys Lys Asp Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 22
<211> 13
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 22

Thr Ile Lys Asp Gln Gln Lys Ala Asn Gln Leu Ala Ser
1 5 10

<210> 23
<211> 14
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 23

Lys Asp Ile Asn Lys Ile Tyr Phe Met Thr Asp Val Asp Leu
1 5 10

<210> 24
<211> 13
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 24

Asp Val Asp Leu Gly Gly Pro Thr Phe Val Leu Asn Asp
1 5 10

<210> 25
<211> 153
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

<400> 25

Met His His His His His His Ala Ser Leu Ser Ser Glu Ile Lys Tyr
1 5 10 15

Thr Ala Pro His Asp Val Thr Ile Lys Asp Gln Gln Lys Ala Asn Gln
20 25 30

Leu Ala Ser Glu Leu Asn Asn Gln Lys Ile Pro His Phe Tyr Asn Tyr
35 40 45

Lys Glu Val Ile His Thr Lys Leu Tyr Lys Asp Asn Leu Phe Asp Val
50 55 60

Lys Ala Lys Glu Pro Tyr Asn Val Thr Ile Thr Ser Asp Lys Tyr Ile

65 70 75 80

Pro Asn Thr Asp Leu Lys Arg Gly Gln Ala Asp Leu Phe Val Ala Glu
85 90 95

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

Ile Gly Thr Lys Lys His His Val Asn Ile Lys Leu Arg Lys Asp Ile
115 120 125

Asn Lys Ile Tyr Phe Met Thr Asp Val Asp Leu Gly Gly Pro Thr Phe
130 135 140

Val Leu Asn Asp Lys Asp Tyr Gln Glu
145 150

<210> 26
<211> 158
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

<400> 26

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser Ala Ser Leu Ser
1 5 10 15

Ser Glu Ile Lys Tyr Thr Ala Pro His Asp Val Thr Ile Lys Asp Gln
20 25 30

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

His Phe Tyr Asn Tyr Lys Glu Val Ile His Thr Lys Leu Tyr Lys Asp
50 55 60

Asn Leu Phe Asp Val Lys Ala Lys Glu Pro Tyr Asn Val Thr Ile Thr
65 70 75 80

Ser Asp Lys Tyr Ile Pro Asn Thr Asp Leu Lys Arg Gly Gln Ala Asp

85 90 95

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

His Gly Lys Ala Ile Ile Gly Thr Lys Lys His His Val Asn Ile Lys
115 120 125

Leu Arg Lys Asp Ile Asn Lys Ile Tyr Phe Met Thr Asp Val Asp Leu
130 135 140

Gly Gly Pro Thr Phe Val Leu Asn Asp Lys Asp Tyr Gln Glu
145 150 155

<210> 27
<211> 50
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

<400> 27

Lys Asp Ile Asn Lys Ile Tyr Phe Met Thr Asp Val Asp Leu Gly Gly
1 5 10 15

Pro Thr Phe Val Leu Asn Asp Lys Asp Tyr Glu Arg Lys Tyr Lys Lys
20 25 30

His Ile Val Ser Gln Phe Gly Phe Asp Leu Lys His Lys Lys Asp Ala
35 40 45

Leu Ala
50

<210> 28
<211> 612
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 28
atgttcaaaa aatatgactc aaaaaattca atcgtattaa aatctattct atcgctaggt
60

atcatctatg ggggaacatt tggaatatat ccaaaagcag acgcgtcaac acaaaattcc
120

tcaagtgtac aagataaaca attacaaaaa gttgaagaag taccaaataa ttcagaaaaa
180

gctttggtta aaaaacttta cgatagatac agcaaggata caataaatgg aaaatctaat
240

aaatctagga attgggttta ttcagagaga cctttaaatg aaaaccaagt tcgtatacat
300

ttagaaggaa catacacagt tgctggcaga gtgtatacac ctaagaggaa tattactctt
360

aataaagaag ttgtcacttt aaaagaattg gatcatatca taagatttgc tcatatttcc
420

tatggcttgt atatgggaga acatttgcct aaaggtaaca tcgtcataaa tacaaaagat
480

ggtggtaaat atacattaga gtcgcataaa gagctacaaa aagataggga aaatgtaaaa
540

attaatacag ccgatataaa aaatgtaact ttcaaacttg tgaaaagtgt taatgacatt
600

gaacaagttt ga
612

<210> 29
<211> 203
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 29

Met Phe Lys Lys Tyr Asp Ser Lys Asn Ser Ile Val Leu Lys Ser Ile
1 5 10 15

Leu Ser Leu Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Thr Phe Gly Ile Tyr Pro Lys
20 25 30

Ala Asp Ala Ser Thr Gln Asn Ser Ser Ser Val Gln Asp Lys Gln Leu
35 40 45

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

```
Lys Leu Tyr Asp Arg Tyr Ser Lys Asp Thr Ile Asn Gly Lys Ser Asn
65                  70                  75                  80

Lys Ser Arg Asn Trp Val Tyr Ser Glu Arg Pro Leu Asn Glu Asn Gln
                85                  90                  95

Val Arg Ile His Leu Glu Gly Thr Tyr Thr Val Ala Gly Arg Val Tyr
            100                 105                 110

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

Glu Leu Asp His Ile Ile Arg Phe Ala His Ile Ser Tyr Gly Leu Tyr
    130                 135                 140

Met Gly Glu His Leu Pro Lys Gly Asn Ile Val Ile Asn Thr Lys Asp
145                 150                 155                 160

Gly Gly Lys Tyr Thr Leu Glu Ser His Lys Glu Leu Gln Lys Asp Arg
                165                 170                 175

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

Leu Val Lys Ser Val Asn Asp Ile Glu Gln Val
        195                 200
```

<210> 30
<211> 168
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 30

```
Ser Thr Gln Asn Ser Ser Ser Val Gln Asp Lys Gln Leu Gln Lys Val
1               5                   10                  15

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

Asp Arg Tyr Ser Lys Asp Thr Ile Asn Gly Lys Ser Asn Lys Ser Arg
        35                  40                  45
```

```
Asn Trp Val Tyr Ser Glu Arg Pro Leu Asn Glu Asn Gln Val Arg Ile
    50                  55                  60

His Leu Glu Gly Thr Tyr Thr Val Ala Gly Arg Val Tyr Thr Pro Lys
65                  70                  75                  80

Arg Asn Ile Thr Leu Asn Lys Glu Val Val Thr Leu Lys Glu Leu Asp
                85                  90                  95

His Ile Ile Arg Phe Ala His Ile Ser Tyr Gly Leu Tyr Met Gly Glu
            100                 105                 110

His Leu Pro Lys Gly Asn Ile Val Ile Asn Thr Lys Asp Gly Gly Lys
        115                 120                 125

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

Lys Ile Asn Thr Ala Asp Ile Lys Asn Val Thr Phe Lys Leu Val Lys
145                 150                 155                 160

Ser Val Asn Asp Ile Glu Gln Val
                165
```

<210> 31
<211> 116
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 31

```
Gln Asp Lys Gln Leu Gln Lys Val Glu Glu Val Pro Asn Asn Ser Glu
1               5                   10                  15

Lys Ala Leu Val Lys Lys Leu Tyr Asp Arg Tyr Ser Lys Asp Thr Ile
            20                  25                  30

Asn Gly Lys Ser Asn Lys Ser Arg Asn Trp Val Tyr Ser Glu Arg Pro
        35                  40                  45

Leu Asn Glu Asn Gln Val Arg Ile His Leu Glu Gly Thr Tyr Thr Val
    50                  55                  60
```

```
Ala Gly Arg Val Tyr Thr Pro Lys Arg Asn Ile Thr Leu Asn Lys Glu
65                  70                  75                  80

Val Val Thr Leu Lys Glu Leu Asp His Ile Ile Arg Phe Ala His Ile
                85                  90                  95

Ser Tyr Gly Leu Tyr Met Gly Glu His Leu Pro Lys Gly Asn Ile Val
            100                 105                 110

Ile Asn Thr Lys
        115
```

<210> 32
<211> 115
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 32

```
Asp Lys Gln Leu Gln Lys Val Glu Glu Val Pro Asn Asn Ser Glu Lys
1               5                   10                  15

Ala Leu Val Lys Lys Leu Tyr Asp Arg Tyr Ser Lys Asp Thr Ile Asn
            20                  25                  30

Gly Lys Ser Asn Lys Ser Arg Asn Trp Val Tyr Ser Glu Arg Pro Leu
        35                  40                  45

Asn Glu Asn Gln Val Arg Ile His Leu Glu Gly Thr Tyr Thr Val Ala
    50                  55                  60

Gly Arg Val Tyr Thr Pro Lys Arg Asn Ile Thr Leu Asn Lys Glu Val
65                  70                  75                  80

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

Tyr Gly Leu Tyr Met Gly Glu His Leu Pro Lys Gly Asn Ile Val Ile
            100                 105                 110

Asn Thr Lys
```

115

<210> 33
<211> 159
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 33

Asp Lys Gln Leu Gln Lys Val Glu Glu Val Pro Asn Asn Ser Glu Lys
1 5 10 15

Ala Leu Val Lys Lys Leu Tyr Asp Arg Tyr Ser Lys Asp Thr Ile Asn
20 25 30

Gly Lys Ser Asn Lys Ser Arg Asn Trp Val Tyr Ser Glu Arg Pro Leu
35 40 45

Asn Glu Asn Gln Val Arg Ile His Leu Glu Gly Thr Tyr Thr Val Ala
50 55 60

Gly Arg Val Tyr Thr Pro Lys Arg Asn Ile Thr Leu Asn Lys Glu Val
65 70 75 80

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

Tyr Gly Leu Tyr Met Gly Glu His Leu Pro Lys Gly Asn Ile Val Ile
100 105 110

Asn Thr Lys Asp Gly Gly Lys Tyr Thr Leu Glu Ser His Lys Glu Leu
115 120 125

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

Val Thr Phe Lys Leu Val Lys Ser Val Asn Asp Ile Glu Gln Val
145 150 155

<210> 34
<211> 14
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 34

Lys Asp Thr Ile Asn Gly Lys Ser Asn Lys Ser Arg Asn Trp
1 5 10

<210> 35
<211> 166
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

<400> 35

Met His His His His His His Asp Lys Gln Leu Gln Lys Val Glu Glu
1 5 10 15

Val Pro Asn Asn Ser Glu Lys Ala Leu Val Lys Lys Leu Tyr Asp Arg
20 25 30

Tyr Ser Lys Asp Thr Ile Asn Gly Lys Ser Asn Lys Ser Arg Asn Trp
35 40 45

Val Tyr Ser Glu Arg Pro Leu Asn Glu Asn Gln Val Arg Ile His Leu
50 55 60

Glu Gly Thr Tyr Thr Val Ala Gly Arg Val Tyr Thr Pro Lys Arg Asn
65 70 75 80

Ile Thr Leu Asn Lys Glu Val Val Thr Leu Lys Glu Leu Asp His Ile
85 90 95

Ile Arg Phe Ala His Ile Ser Tyr Gly Leu Tyr Met Gly Glu His Leu
100 105 110

Pro Lys Gly Asn Ile Val Ile Asn Thr Lys Asp Gly Gly Lys Tyr Thr
115 120 125

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

Asn Thr Ala Asp Ile Lys Asn Val Thr Phe Lys Leu Val Lys Ser Val

145 150 155 160

Asn Asp Ile Glu Gln Val
165

<210> 36
<211> 171
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

<400> 36

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser Asp Lys Gln Leu
1 5 10 15

Gln Lys Val Glu Glu Val Pro Asn Asn Ser Glu Lys Ala Leu Val Lys
20 25 30

Lys Leu Tyr Asp Arg Tyr Ser Lys Asp Thr Ile Asn Gly Lys Ser Asn
35 40 45

Lys Ser Arg Asn Trp Val Tyr Ser Glu Arg Pro Leu Asn Glu Asn Gln
50 55 60

Val Arg Ile His Leu Glu Gly Thr Tyr Thr Val Ala Gly Arg Val Tyr
65 70 75 80

Thr Pro Lys Arg Asn Ile Thr Leu Asn Lys Glu Val Val Thr Leu Lys
85 90 95

Glu Leu Asp His Ile Ile Arg Phe Ala His Ile Ser Tyr Gly Leu Tyr
100 105 110

Met Gly Glu His Leu Pro Lys Gly Asn Ile Val Ile Asn Thr Lys Asp
115 120 125

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

Glu Asn Val Lys Ile Asn Thr Ala Asp Ile Lys Asn Val Thr Phe Lys

145 150 155 160

Leu Val Lys Ser Val Asn Asp Ile Glu Gln Val
165 170

<210> 37
<211> 720
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 37
atgaataaaa atatagtcat taaaagcatg gcagcattag ccattctaac ctcagtaact
60

ggaataaatg ctgcagtcgt tgaagagaca caacaaatag caaatgcaga gaagaatgtt
120

acgcaagtta aagatacaaa tatttttcca tataatggcg tcgtttcatt taaagatgcg
180

acaggttttg taattggaaa aaatacaatt atcaccaata aacatgtatc aaaagattat
240

aaagttggcg atagaattac tgcccatcca aacggtgaca aaggaaatgg tggtatatat
300

aaaattaaaa gcatttctga ttatccgggt gatgaagaca tctctgtcat gaatattgaa
360

gaacaagcag tcgaacgtgg accaaaaggc tttaatttta atgaaaatgt ccaagcattc
420

aattttgcga aagatgctaa agttgatgac aaaattaaag ttattggtta cccattacct
480

gctcaaaata gttttaaaca gtttgaatct acaggaacta taaaaagaat caaagacaat
540

attttaaatt ttgatgcata cattgaaccc gggaattcag gatcaccagt tctaaattct
600

aacaatgagg tcataggtgt ggtgtatggc ggtattggaa aaattggttc tgaatataat
660

ggtgccgtat actttacgcc tcaaatcaaa gattttattc aaaagcacat tgaacaataa
720

<210> 38
<211> 239
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 38

```
Met Asn Lys Asn Ile Val Ile Lys Ser Met Ala Ala Leu Ala Ile Leu
1               5                  10                  15

Thr Ser Val Thr Gly Ile Asn Ala Ala Val Val Glu Glu Thr Gln Gln
            20                  25                  30

Ile Ala Asn Ala Glu Lys Asn Val Thr Gln Val Lys Asp Thr Asn Ile
        35                  40                  45

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

Ile Gly Lys Asn Thr Ile Ile Thr Asn Lys His Val Ser Lys Asp Tyr
65                  70                  75                  80

Lys Val Gly Asp Arg Ile Thr Ala His Pro Asn Gly Asp Lys Gly Asn
                85                  90                  95

Gly Gly Ile Tyr Lys Ile Lys Ser Ile Ser Asp Tyr Pro Gly Asp Glu
            100                 105                 110

Asp Ile Ser Val Met Asn Ile Glu Glu Gln Ala Val Glu Arg Gly Pro
        115                 120                 125

Lys Gly Phe Asn Phe Asn Glu Asn Val Gln Ala Phe Asn Phe Ala Lys
    130                 135                 140

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

Ala Gln Asn Ser Phe Lys Gln Phe Glu Ser Thr Gly Thr Ile Lys Arg
                165                 170                 175

Ile Lys Asp Asn Ile Leu Asn Phe Asp Ala Tyr Ile Glu Pro Gly Asn
            180                 185                 190

Ser Gly Ser Pro Val Leu Asn Ser Asn Asn Glu Val Ile Gly Val Val
        195                 200                 205
```

```
Tyr Gly Gly Ile Gly Lys Ile Gly Ser Glu Tyr Asn Gly Ala Val Tyr
    210                 215                 220

Phe Thr Pro Gln Ile Lys Asp Phe Ile Gln Lys His Ile Glu Gln
225                 230                 235
```

<210> 39
<211> 199
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 39

```
Thr Gln Val Lys Asp Thr Asn Ile Phe Pro Tyr Asn Gly Val Val Ser
1               5                   10                  15

Phe Lys Asp Ala Thr Gly Phe Val Ile Gly Lys Asn Thr Ile Ile Thr
            20                  25                  30

Asn Lys His Val Ser Lys Asp Tyr Lys Val Gly Asp Arg Ile Thr Ala
        35                  40                  45

His Pro Asn Gly Asp Lys Gly Asn Gly Gly Ile Tyr Lys Ile Lys Ser
    50                  55                  60

Ile Ser Asp Tyr Pro Gly Asp Glu Asp Ile Ser Val Met Asn Ile Glu
65                  70                  75                  80

Glu Gln Ala Val Glu Arg Gly Pro Lys Gly Phe Asn Phe Asn Glu Asn
                85                  90                  95

Val Gln Ala Phe Asn Phe Ala Lys Asp Ala Lys Val Asp Asp Lys Ile
            100                 105                 110

Lys Val Ile Gly Tyr Pro Leu Pro Ala Gln Asn Ser Phe Lys Gln Phe
        115                 120                 125

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

Asp Ala Tyr Ile Glu Pro Gly Asn Ser Gly Ser Pro Val Leu Asn Ser
145                 150                 155                 160
```

Asn Asn Glu Val Ile Gly Val Val Tyr Gly Gly Ile Gly Lys Ile Gly
165 170 175

Ser Glu Tyr Asn Gly Ala Val Tyr Phe Thr Pro Gln Ile Lys Asp Phe
180 185 190

Ile Gln Lys His Ile Glu Gln
195

<210> 40
<211> 206
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

<400> 40

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

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

Gly Lys Asn Thr Ile Ile Thr Asn Lys His Val Ser Lys Asp Tyr Lys
35 40 45

Val Gly Asp Arg Ile Thr Ala His Pro Asn Gly Asp Lys Gly Asn Gly
50 55 60

Gly Ile Tyr Lys Ile Lys Ser Ile Ser Asp Tyr Pro Gly Asp Glu Asp
65 70 75 80

Ile Ser Val Met Asn Ile Glu Glu Gln Ala Val Glu Arg Gly Pro Lys
85 90 95

Gly Phe Asn Phe Asn Glu Asn Val Gln Ala Phe Asn Phe Ala Lys Asp
100 105 110

Ala Lys Val Asp Asp Lys Ile Lys Val Ile Gly Tyr Pro Leu Pro Ala
115 120 125

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

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

Gly Ser Pro Val Leu Asn Ser Asn Asn Glu Val Ile Gly Val Val Tyr
165 170 175

Gly Gly Ile Gly Lys Ile Gly Ser Glu Tyr Asn Gly Ala Val Tyr Phe
180 185 190

Thr Pro Gln Ile Lys Asp Phe Ile Gln Lys His Ile Glu Gln
195 200 205

<210> 41
<211> 211
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

<400> 41

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser Thr Gln Val Lys
1 5 10 15

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

Thr Gly Phe Val Ile Gly Lys Asn Thr Ile Ile Thr Asn Lys His Val
35 40 45

Ser Lys Asp Tyr Lys Val Gly Asp Arg Ile Thr Ala His Pro Asn Gly
50 55 60

Asp Lys Gly Asn Gly Gly Ile Tyr Lys Ile Lys Ser Ile Ser Asp Tyr
65 70 75 80

Pro Gly Asp Glu Asp Ile Ser Val Met Asn Ile Glu Glu Gln Ala Val
85 90 95

```
Glu Arg Gly Pro Lys Gly Phe Asn Phe Asn Glu Asn Val Gln Ala Phe
            100                 105                 110

Asn Phe Ala Lys Asp Ala Lys Val Asp Asp Lys Ile Lys Val Ile Gly
        115                 120                 125

Tyr Pro Leu Pro Ala Gln Asn Ser Phe Lys Gln Phe Glu Ser Thr Gly
    130                 135                 140

Thr Ile Lys Arg Ile Lys Asp Asn Ile Leu Asn Phe Asp Ala Tyr Ile
145                 150                 155                 160

Glu Pro Gly Asn Ser Gly Ser Pro Val Leu Asn Ser Asn Asn Glu Val
                165                 170                 175

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

Gly Ala Val Tyr Phe Thr Pro Gln Ile Lys Asp Phe Ile Gln Lys His
        195                 200                 205

Ile Glu Gln
    210
```

<210> 42
<211> 600
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 42
atggcaatga actttaaagt ctttgacaat agtcaacttg tagcagaata tgctgctgat
60

attattagaa agcaatttaa caataatcct actacaattg caggttttca tttagataca
120

gatcaagcgc cagttctaga tgaattaaag aaaaatgttg aaaaacatgc tgttgatttt
180

agccaaataa atattttaga ttatgacgat aaaaaatcat atttcgaagc gttaggtgta
240

ccagcaggtc aagtttatcc aattgcttat gaaaaagatg caatcgaatt aatcgctgat
300

aagattaaaa ctaaagaaaa taaagggaaa ttaacattac aagttgtttc tatcgatgag
360

caaggtaagt taaatgttag tattcgtcaa ggactaatgg aagcaagaga aattttctta
420

gtagtgacag gtgctaataa acgagatgta gttgaaaaat tatatcaaga aaatggtaaa
480

acaagcttcg aaccagccga tttaaaagca catagaatgg taaatgttat tcttgataaa
540

gaagcggctg caggtttacc tgaagatgtt aaagcttact ttacgtcacg ctttgcttaa
600

<210> 43
<211> 199
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 43

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

Tyr Ala Ala Asp Ile Ile Arg Lys Gln Phe Asn Asn Asn Pro Thr Thr
20 25 30

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

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

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

Pro Ala Gly Gln Val Tyr Pro Ile Ala Tyr Glu Lys Asp Ala Ile Glu
85 90 95

Leu Ile Ala Asp Lys Ile Lys Thr Lys Glu Asn Lys Gly Lys Leu Thr
100 105 110

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

Arg Gln Gly Leu Met Glu Ala Arg Glu Ile Phe Leu Val Val Thr Gly
130 135 140

Ala Asn Lys Arg Asp Val Val Glu Lys Leu Tyr Gln Glu Asn Gly Lys
145 150 155 160

Thr Ser Phe Glu Pro Ala Asp Leu Lys Ala His Arg Met Val Asn Val
165 170 175

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

Tyr Phe Thr Ser Arg Phe Ala
195

<210> 44
<211> 206
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

<400> 44

Met His His His His His His Met Ala Met Asn Phe Lys Val Phe Asp
1 5 10 15

Asn Ser Gln Leu Val Ala Glu Tyr Ala Ala Asp Ile Ile Arg Lys Gln
20 25 30

Phe Asn Asn Asn Pro Thr Thr Ile Ala Gly Phe His Leu Asp Thr Asp
35 40 45

Gln Ala Pro Val Leu Asp Glu Leu Lys Lys Asn Val Glu Lys His Ala
50 55 60

Val Asp Phe Ser Gln Ile Asn Ile Leu Asp Tyr Asp Asp Lys Lys Ser
65 70 75 80

Tyr Phe Glu Ala Leu Gly Val Pro Ala Gly Gln Val Tyr Pro Ile Ala
85 90 95

```
Tyr Glu Lys Asp Ala Ile Glu Leu Ile Ala Asp Lys Ile Lys Thr Lys
            100                 105                 110

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

Gly Lys Leu Asn Val Ser Ile Arg Gln Gly Leu Met Glu Ala Arg Glu
    130                 135                 140

Ile Phe Leu Val Val Thr Gly Ala Asn Lys Arg Asp Val Val Glu Lys
145                 150                 155                 160

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

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

Leu Pro Glu Asp Val Lys Ala Tyr Phe Thr Ser Arg Phe Ala
        195                 200                 205
```

<210> 45
<211> 14
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 45

```
Asp Ile Ile Arg Lys Gln Phe Asn Asn Asn Pro Thr Thr Ile
1               5                   10
```

<210> 46
<211> 14
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 46

```
Tyr Phe Glu Ala Leu Gly Val Pro Ala Gly Gln Val Tyr Pro
1               5                   10
```

<210> 47
<211> 14

<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 47

Ala Asp Lys Ile Lys Thr Lys Glu Asn Lys Gly Lys Leu Thr
1 5 10

<210> 48
<211> 14
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 48

Gln Glu Asn Gly Lys Thr Ser Phe Glu Pro Ala Asp Leu Lys
1 5 10

<210> 49
<211> 429
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 49
atgatattga acttcaatca attcgagaat caaaactttt ttaacggtaa tccaagtgat
60

acatttaaag atttaggtaa acaagtattt aattactttt caacaccttc atttgtaacg
120

aatatatatg aaacagacga attatattac ttagaagctg aactagcagg tgtaaataaa
180

gaagatatta gtatcgattt caataataat acgctcacta ttcaagctac tagaagcgca
240

aaatacaaat ctgaacaact cattttagat gagcgtaact tcgaatcatt aatgcgtcaa
300

tttgattttg aagctgttga taagcaacat attactgcta gttttgaaaa tgggttatta
360

accattacct tgcctaaaat caaaccaagc aatgaaacta cttcatcaac atctattcca
420

atttcatag
429

<210> 50
<211> 93
<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 50

```
Met Ile Leu Asn Phe Asn Gln Phe Glu Asn Gln Asn Phe Phe Asn Gly
1               5                  10                  15

Asn Pro Ser Asp Thr Phe Lys Asp Leu Gly Lys Gln Val Phe Asn Tyr
            20                  25                  30

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

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

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

Lys Tyr Lys Ser Glu Gln Leu Ile Leu Asp Glu Arg Asn
                85                  90
```

<210> 51
<211> 100
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 51

```
Met His His His His His His Met Ile Leu Asn Phe Asn Gln Phe Glu
1               5                  10                  15

Asn Gln Asn Phe Phe Asn Gly Asn Pro Ser Asp Thr Phe Lys Asp Leu
            20                  25                  30

Gly Lys Gln Val Phe Asn Tyr Phe Ser Thr Pro Ser Phe Val Thr Asn
        35                  40                  45

Ile Tyr Glu Thr Asp Glu Leu Tyr Tyr Leu Glu Ala Glu Leu Ala Gly
    50                  55                  60

Val Asn Lys Glu Asp Ile Ser Ile Asp Phe Asn Asn Asn Thr Leu Thr
65                  70                  75                  80
```

Ile Gln Ala Thr Arg Ser Ala Lys Tyr Lys Ser Glu Gln Leu Ile Leu
85 90 95

Asp Glu Arg Asn
100

<210> 52
<211> 14
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 52

Asn Gly Asn Pro Ser Asp Thr Phe Lys Asp Leu Gly Lys Gln
1 5 10

<210> 53
<211> 14
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 53

Glu Asp Ile Ser Ile Asp Phe Asn Asn Asn Thr Leu Thr Ile
1 5 10

<210> 54
<211> 807
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

<400> 54
ctagaatcta gagagcaatt atcagtcgaa gaatacgaaa cattctttaa cagatttgat
60

aatcaagaat ttgatttcga acgtgaattg acacaagatc catattcaaa agtatactta
120

tacagtatag aagaccatat cagaacatat aagatagaga aaggaggtgg cggttcagga
180

ggtggaggat ctggaggcgg tggatcaacg caagttaaag atacaaatat ttttccatat
240

aatggcgtcg tttcatttaa agatgcgaca ggttttgtaa ttggaaaaaa tacaattatc
300

accaataaac atgtatcaaa agattataaa gttggcgata gaattactgc ccatccaaac
360

ggtgacaaag gaaatggtgg tatatataaa attaaaagca tttctgatta tccgggtgat
420

gaagacatct ctgtcatgaa tattgaagaa caagcagtcg aacgtggacc aaaaggcttt
480

aattttaatg aaaatgtcca agcattcaat tttgcgaaag atgctaaagt tgatgacaaa
540

attaaagtta ttggttaccc attacctgct caaaatagtt ttaaacagtt tgaatctaca
600

ggaactataa aaagaatcaa agacaatatt ttaaattttg atgcatacat tgaacccggg
660

aattcaggat caccagttct aaattctaac aatgaggtca taggtgtggt gtatggcggt
720

attggaaaaa ttggttctga atataatggt gccgtatact ttacgcctca aatcaaagat
780

tttattcaaa agcacattga acaataa
807

<210> 55
<211> 268
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

<400> 55

Leu Glu Ser Arg Glu Gln Leu Ser Val Glu Glu Tyr Glu Thr Phe Phe
1 5 10 15

Asn Arg Phe Asp Asn Gln Glu Phe Asp Phe Glu Arg Glu Leu Thr Gln
20 25 30

Asp Pro Tyr Ser Lys Val Tyr Leu Tyr Ser Ile Glu Asp His Ile Arg
35 40 45

Thr Tyr Lys Ile Glu Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
50 55 60

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

Asn Gly Val Val Ser Phe Lys Asp Ala Thr Gly Phe Val Ile Gly Lys
                85                  90                  95

Asn Thr Ile Ile Thr Asn Lys His Val Ser Lys Asp Tyr Lys Val Gly
            100                 105                 110

Asp Arg Ile Thr Ala His Pro Asn Gly Asp Lys Gly Asn Gly Gly Ile
        115                 120                 125

Tyr Lys Ile Lys Ser Ile Ser Asp Tyr Pro Gly Asp Glu Asp Ile Ser
    130                 135                 140

Val Met Asn Ile Glu Glu Gln Ala Val Glu Arg Gly Pro Lys Gly Phe
145                 150                 155                 160

Asn Phe Asn Glu Asn Val Gln Ala Phe Asn Phe Ala Lys Asp Ala Lys
                165                 170                 175

Val Asp Asp Lys Ile Lys Val Ile Gly Tyr Pro Leu Pro Ala Gln Asn
            180                 185                 190

Ser Phe Lys Gln Phe Glu Ser Thr Gly Thr Ile Lys Arg Ile Lys Asp
        195                 200                 205

Asn Ile Leu Asn Phe Asp Ala Tyr Ile Glu Pro Gly Asn Ser Gly Ser
    210                 215                 220

Pro Val Leu Asn Ser Asn Asn Glu Val Ile Gly Val Val Tyr Gly Gly
225                 230                 235                 240

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

Gln Ile Lys Asp Phe Ile Gln Lys His Ile Glu Gln
            260                 265
```

<210> 56

<211> 825
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

<400> 56
atgcaccacc accaccacca cctggaatcc cgtgaacaac tgtccgtcga agaatacgaa
60

accttcttta accgctttga taaccaagaa tttgatttcg aacgtgaact gacccaggat
120

ccgtattcta aagtgtatct gtacagtatc gaagatcata ttcgcacgta caaaatcgaa
180

aaaggcggtg gcggttctgg cggtggcggt agtggcggtg gcggtagcac ccaggtgaaa
240

gatacgaata tctttccgta taacggcgtg gtttctttta aagatgcgac cggcttcgtt
300

atcggtaaaa acaccatcat cacgaacaaa catgtgagca aagattacaa agttggcgat
360

cgtattaccg cccacccgaa tggcgataag ggtaacggcg gtatctacaa aatcaaaagc
420

atctctgatt acccgggtga tgaagatatc agcgtgatga atattgaaga acaggcagtt
480

gaacgcggcc cgaaaggttt taacttcaat gaaaacgttc aggcgtttaa tttcgcgaaa
540

gatgccaaag tggatgataa aatcaaagtt attggctatc cgctgccggc ccagaacagc
600

tttaaacagt tcgaatctac cggtacgatc aaacgtatca aagataacat cctgaacttc
660

gatgcatata ttgaaccggg caatagtggt agcccggtgc tgaacagtaa caatgaagtt
720

attggtgtgg tttatggcgg tatcggcaaa attggtagcg aatacaacgg tgctgtgtat
780

tttacgccgc agatcaaaga cttcatccag aaacatatcg aacaa
825

<210> 57
<211> 275
<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

<400> 57

```
Met His His His His His His Leu Glu Ser Arg Glu Gln Leu Ser Val
1               5                  10                  15

Glu Glu Tyr Glu Thr Phe Phe Asn Arg Phe Asp Asn Gln Glu Phe Asp
            20                  25                  30

Phe Glu Arg Glu Leu Thr Gln Asp Pro Tyr Ser Lys Val Tyr Leu Tyr
        35                  40                  45

Ser Ile Glu Asp His Ile Arg Thr Tyr Lys Ile Glu Lys Gly Gly Gly
    50                  55                  60

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr Gln Val Lys
65                  70                  75                  80

Asp Thr Asn Ile Phe Pro Tyr Asn Gly Val Val Ser Phe Lys Asp Ala
                85                  90                  95

Thr Gly Phe Val Ile Gly Lys Asn Thr Ile Ile Thr Asn Lys His Val
            100                 105                 110

Ser Lys Asp Tyr Lys Val Gly Asp Arg Ile Thr Ala His Pro Asn Gly
        115                 120                 125

Asp Lys Gly Asn Gly Gly Ile Tyr Lys Ile Lys Ser Ile Ser Asp Tyr
    130                 135                 140

Pro Gly Asp Glu Asp Ile Ser Val Met Asn Ile Glu Glu Gln Ala Val
145                 150                 155                 160

Glu Arg Gly Pro Lys Gly Phe Asn Phe Asn Glu Asn Val Gln Ala Phe
                165                 170                 175

Asn Phe Ala Lys Asp Ala Lys Val Asp Asp Lys Ile Lys Val Ile Gly
            180                 185                 190
```

Tyr Pro Leu Pro Ala Gln Asn Ser Phe Lys Gln Phe Glu Ser Thr Gly
195 200 205

Thr Ile Lys Arg Ile Lys Asp Asn Ile Leu Asn Phe Asp Ala Tyr Ile
210 215 220

Glu Pro Gly Asn Ser Gly Ser Pro Val Leu Asn Ser Asn Asn Glu Val
225 230 235 240

Ile Gly Val Val Tyr Gly Gly Ile Gly Lys Ile Gly Ser Glu Tyr Asn
245 250 255

Gly Ala Val Tyr Phe Thr Pro Gln Ile Lys Asp Phe Ile Gln Lys His
260 265 270

Ile Glu Gln
275

<210> 58
<211> 280
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

<400> 58

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser Leu Glu Ser Arg
1 5 10 15

Glu Gln Leu Ser Val Glu Glu Tyr Glu Thr Phe Phe Asn Arg Phe Asp
20 25 30

Asn Gln Glu Phe Asp Phe Glu Arg Glu Leu Thr Gln Asp Pro Tyr Ser
35 40 45

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

Glu Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
65 70 75 80

```
Ser Thr Gln Val Lys Asp Thr Asn Ile Phe Pro Tyr Asn Gly Val Val
                85                  90                  95

Ser Phe Lys Asp Ala Thr Gly Phe Val Ile Gly Lys Asn Thr Ile Ile
            100                 105                 110

Thr Asn Lys His Val Ser Lys Asp Tyr Lys Val Gly Asp Arg Ile Thr
        115                 120                 125

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

Ser Ile Ser Asp Tyr Pro Gly Asp Glu Asp Ile Ser Val Met Asn Ile
145                 150                 155                 160

Glu Glu Gln Ala Val Glu Arg Gly Pro Lys Gly Phe Asn Phe Asn Glu
                165                 170                 175

Asn Val Gln Ala Phe Asn Phe Ala Lys Asp Ala Lys Val Asp Asp Lys
            180                 185                 190

Ile Lys Val Ile Gly Tyr Pro Leu Pro Ala Gln Asn Ser Phe Lys Gln
        195                 200                 205

Phe Glu Ser Thr Gly Thr Ile Lys Arg Ile Lys Asp Asn Ile Leu Asn
    210                 215                 220

Phe Asp Ala Tyr Ile Glu Pro Gly Asn Ser Gly Ser Pro Val Leu Asn
225                 230                 235                 240

Ser Asn Asn Glu Val Ile Gly Val Val Tyr Gly Gly Ile Gly Lys Ile
                245                 250                 255

Gly Ser Glu Tyr Asn Gly Ala Val Tyr Phe Thr Pro Gln Ile Lys Asp
            260                 265                 270

Phe Ile Gln Lys His Ile Glu Gln
        275                 280
```

<210> 59

<211> 45
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

<400> 59
ggaggtggcg gttcaggagg tggaggatct ggaggcggtg gatca
45

<210> 60
<211> 15
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

<400> 60

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 61
<211> 5
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

<400> 61

Glu Arg Lys Tyr Lys
1 5

<210> 62
<211> 10
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

<400> 62

Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys
1 5 10

<210> 63
<211> 5
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

<400> 63

Glu Ala Ala Ala Lys
1 5

<210> 64
<211> 15
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

<400> 64

Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys
1 5 10 15

<210> 65
<211> 10
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

<400> 65

Glu Arg Lys Tyr Lys Glu Arg Lys Tyr Lys
1 5 10

<210> 66
<211> 15
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

<400> 66

Glu Arg Lys Tyr Lys Glu Arg Lys Tyr Lys Glu Arg Lys Tyr Lys
1 5 10 15

<210> 67
<211> 5
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

<400> 67

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 68
<211> 10
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

<400> 68

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 69
<211> 6
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

<220>
<221> característica_misc
<222> (1)..(1)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (3)..(3)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (5)..(5)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<400> 69

Xaa Pro Xaa Pro Xaa Pro
1 5

<210> 70
<211> 12
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

<220>
<221> característica_misc
<222> (1)..(1)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (3)..(3)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (5)..(5)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (7)..(7)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (9)..(9)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (11)..(11)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<400> 70

Xaa Pro Xaa Pro Xaa Pro Xaa Pro Xaa Pro Xaa Pro
1 5 10

<210> 71
<211> 612
<212> ADN

<213> Staphylococcus aureus

<400> 71
atgttcaaaa aaaatgactc gaaaaattca attctattaa aatctattct atcgctaggt
60

atcatctatg ggggaacatt tggaatatat ccaaaagcag acgcgtcaac acaaaattcc
120

ccaagtgtac aagataaaca attccaaaaa gttgaagaag taccaaataa ttcagaaaaa
180

gctttggtta aaaaacttta cgatagatac agccaaaata caataaacgg aaaatctaat
240

aaatctagga attgggttta ttcagagaga cctttaaatg aaaaccaagt tcgtataaat
300

ttagaaggaa catacagagt tgctgataga gtatatacac ctaagagaaa tattactctt
360

aataaagaag ttgtcacttt aaaggaattg gatcatatca taagatttgc tcatatttct
420

tatggcttat atatgggaga acatttgcct aaaggtaaca tcgtcataaa tacaaaagat
480

ggcggtaaat atacattaga gtcgcataaa gagctacaaa aagataggga aaatgtaaaa
540

attaatacag ccgatataaa aaatgtaact ttcaaacttg tgaaaagtgt taatgacatt
600

gaacaagttt ga
612

<210> 72
<211> 612
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 72
atgttcaaaa aaaatgactc gaaaaattca attctattaa aatctattct atcgctaggt
60

atcatctatg ggggaacatt tggaatatat ccaaaagcag acgcgtcaac acaaaattcc
120

ccaagtgtac aagataaaca attccaaaaa gttgaagaag taccaaataa ttcagaaaaa
180

gctttggtta aaaaacttta cgatagatac agccaaaata caataaacgg aaaatctaat
240

aaatctagga attgggttta ttcagagaga cctttaaatg aaaaccaagt tcgtataaat
300

ttagaaggaa catacagagt tgctgataga gtatatacac ctaagagaaa tattactctt
360

aataaagaag ttgtcacttt aaaggaattg gatcatatca taagatttgc tcatatttct
420

tatggcttat atatgggaga acatttgcct aaaggtaaca tcgtcataaa tacaaaagat
480

ggcggtaaat atacattaga gtcgcataaa gagctacaaa aagataggga aaatgtaaaa
540

attaatacag ccgatataaa aaatgtaact ttcaaacttg tgaaaagtgt taatgacatt
600

gaacaagttt ga
612

<210> 73
<211> 612
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 73
atgttcaaaa aatatgactc aaaaaattca atcgtattaa aatctattct atcgctaggt
60

atcatctatg ggggaacatt tggaatatat ccaaaagcag acgcgtcaac acaaaattcc
120

tcaagtgtac aagataaaca attacaaaaa gttgaagaag taccaaataa ttcagaaaaa
180

gctttggtta aaaaacttta cgatagatac agcaaggata caataaatgg aaaatctaat
240

aaatctagga attgggttta ttcagagaga cctttaaatg aaaaccaagt tcgtatacat
300

ttagaaggaa catacacagt tgctggcaga gtgtatacac ctaagaggaa tattactctt
360

aataaagaag ttgtcacttt aaaagaattg gatcatatca taagatttgc tcatatttcc
420

tatggcttgt atatgggaga acatttgcct aaaggtaaca tcgtcataaa tacaaaagat
480

ggtggtaaat atacattaga gtcgcataaa gagctacaaa aagataggga aaatgtaaaa
540

attaatacag ccgatataaa aaatgtaact ttcaaacttg tgaaaagtgt taatgacatt
600

gaacaagttt ga
612

<210> 74
<211> 612
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 74
atgttcaaaa aatatgactc aaaaaattca atcgtattaa aatctattct atcgctaggt
60

atcatctatg ggggaacatt tggaatatat ccaaaagcag acgcgtcaac acaaaattcc
120

tcaagtgtac aagataaaca attacaaaaa gttgaagaag taccaaataa ttcagaaaaa
180

gctttggtta aaaaacttta cgatagatac agcaaggata caataaatgg aaaatctaat
240

aaatctagga attgggttta ttcagagaga cctttaaatg aaaaccaagt tcgtatacat
300

ttagaaggaa catacacagt tgctggcaga gtgtatacac ctaagaggaa tattactctt
360

aataaagaag ttgtcacttt aaaagaattg gatcatatca taagatttgc tcatatttcc
420

tatggcttgt atatgggaga acatttgcct aaaggtaaca tcgtcataaa tacaaaagat
480

ggtggtaaat atacattaga gtcgcataaa gagctacaaa aagataggga aaatgtaaaa
540

attaatacag ccgatataaa aaatgtaact ttcaaacttg tgaaaagtgt taatgacatt
600

gaacaagttt ga
612

<210> 75
<211> 612
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 75
atgttcaaaa aatatgactc aaaaaattca atcgtattaa aatctattct atcgctaggt
60

atcatctatg ggggaacatt tggaatatat ccaaaagcag acgcgtcaac acaaaattcc
120

tcaagtgtac aagataaaca attacaaaaa gttgaagaag taccaaataa ttcagaaaaa
180

gctttggtta aaaaacttta cgatagatac agcaaggata caataaatgg aaaatctaat
240

aaatctagga attgggttta ttcagagaga cctttaaatg aaaaccaagt tcgtatacat
300

ttagaaggaa catacacagt tgctggcaga gtgtatacac ctaagaggaa tattactctt
360

aataaagaag ttgtcacttt aaaagaattg gatcatatca taagatttgc tcatatttcc
420

tatggcttgt atatgggaga acatttgcct aaaggtaaca tcgtcataaa tacaaaagat
480

ggtggtaaat atacattaga gtcgcataaa gagctacaaa aagataggga aaatgtaaaa
540

attaatacag ccgatataaa aaatgtaact ttcaaacttg tgaaaagtgt taatgacatt
600

gaacaagttt ga
612

<210> 76
<211> 612
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 76
atgttcaaaa aatatgactc aaaaaattca atcgtattaa aatctattct atcgctaggt
60

atcatctatg ggggaacatt tggaatatat ccaaaagcag acgcgtcaac acaaaattcc
120

tcaagtgtac aagataaaca attacaaaaa gttgaagaag taccaaataa ttcagaaaaa
180

gctttggtta aaaaacttta cgatagatac agcaaggata caataaatgg aaaatctaat
240

aaatctagga attgggttta ttcagagaga cctttaaatg aaaaccaagt tcgtatacat
300

ttagaaggaa catacacagt tgctgataga gtatatacac ctaagagaaa tattactctt
360

aataaagaag ttgtcacttt aaaggaattg gatcatatca taagatttgc tcatatttct
420

tatggcttat atatgggaga acatttgcct aaaggtaaca tcgtcataaa tacaaaagat
480

ggcggtaaat atacattaga gtcgcataaa gagctacaaa aagataggga aaatgtaaaa
540

attaatacag ccgatataaa aaatgtaact ttcaaacttg tgaaaagtgt taatgacatt
600

gaacaagttt ga
612

<210> 77
<211> 612
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 77
atgttcaaaa aatatgactc aaaaaattca atcgtattaa aatctattct atcgctaggt
60

atcatctatg ggggaacatt tggaatatat ccaaaagcag acgcgtcaac acaaaattcc
120

tcaagtgtac aagataaaca attacaaaaa gttgaagaag taccaaataa ttcagaaaaa
180

gctttggtta aaaaacttta cgatagatac agcaaggata caataaatgg aaaatctaat
240

aaatctagga attgggttta ttcagagaga cctttaaatg aaaaccaagt tcgtatacat
300

ttagaaggaa catacacagt tgctgataga gtatatacac ctaagagaaa tattactctt
360

aataaagaag ttgtcacttt aaaggaattg gatcatatca taagatttgc tcatatttct
420

tatggcttat atatgggaga acatttgcct aaaggtaaca tcgtcataaa tacaaaagat
480

ggcggtaaat atacattaga gtcgcataaa gagctacaaa aagataggga aaatgtaaaa
540

attaatacag ccgatataaa aaatgtaact ttcaaacttg tgaaaagtgt taatgacatt
600

gaacaagttt ga
612

<210> 78
<211> 612
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 78
atgttcaaaa aatatgactc aaaaaattca atcgtattaa aatctattct atcgctaggt
60

atcatctatg ggggaacatt tggaatatat ccaaaagcag acgcgtcaac acaaaattcc
120

tcaagtgtac aagataaaca attacaaaaa gttgaagaag taccaaataa ttcagaaaaa
180

gctttggtta aaaaacttta cgatagatac agcaaggata caataaatgg aaaatctaat
240

aaatctagga attgggttta ttcagagaga cctttaaatg aaaaccaagt tcgtatacat
300

ttagaaggaa catacacagt tgctgataga gtatatacac ctaagagaaa tattactctt
360

aataaagaag ttgtcacttt aaaggaattg gatcatatca taagatttgc tcatatttct
420

tatggcttat atatgggaga acatttgcct aaaggtaaca tcgtcataaa tacaaaagat
480

ggcggtaaat atacattaga gtcgcataaa gagctacaaa aagataggga aaatgtaaaa
540

attaatacag ccgatataaa aaatgtaact ttcaaacttg tgaaaagtgt taatgacatt
600

gaacaagttt ga
612

<210> 79
<211> 612
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 79

atgttcaaaa aatatgactc aaaaaattca atcgtattaa aatctattct atcgctaggt
60

atcatctatg ggggaacatt tggaatatat ccaaaagcag acgcgtcaac acaaaattcc
120

tcaagtgtac aagataaaca attacaaaaa gttgaagaag taccaaataa ttcagaaaaa
180

gctttggtta aaaaacttta cgatagatac agcaaggata caataaatgg aaaatctaat
240

aaatctagga attgggttta ttcagagaga cctttaaatg aaaaccaagt tcgtatacat
300

ttagaaggaa catacacagt tgctgataga gtatatacac ctaagagaaa tattactctt
360

aataaagaag ttgtcacttt aaaggaattg gatcatatca taagatttgc tcatatttct
420

tatggcttat atatgggaga acatttgcct aaaggtaaca tcgtcataaa tacaaaagat
480

ggcggtaaat atacattaga gtcgcataaa gagctacaaa aagataggga aaatgtaaaa
540

attaatacag ccgatataaa aaatgtaact ttcaaacttg tgaaaagtgt taatgacatt
600

gaacaagttt ga
612

<210> 80
<211> 612
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 80
atgttcaaaa aatatgactc aaaaaattca atcgtattaa aatctattct atcgctaggt
60

atcatctatg ggggaacatt tggaatatat ccaaaagcag acgcgtcaac acaaaattcc
120

tcaagtgtac aagataaaca attacaaaaa gttgaagaag taccaaataa ttcagaaaaa
180

gctttggtta aaaaacttta cgatagatac agcaaggata caataaatgg aaaatctaat
240

aaatctagga attgggttta ttcagagaga cctttaaatg aaaaccaagt tcgtatacat
300

ttagaaggaa catacacagt tgctgataga gtatatacac ctaagagaaa tattactctt
360

aataaagaag ttgtcacttt aaaggaattg gatcatatca taagatttgc tcatatttct
420

tatggcttat atatgggaga acatttgcct aaaggtaaca tcgtcataaa tacaaaagat
480

ggcggtaaat atacattaga gtcgcataaa gagctacaaa aagataggga aaatgtaaaa
540

attaatacag ccgatataaa aaatgtaact ttcaaacttg tgaaaagtgt taatgacatt
600

gaacaagttt ga
612

<210> 81
<211> 612
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 81
atgttcaaaa aatatgactc aaaaaattca atcgtattaa aatctattct atcgctaggt
60

atcatctatg ggggaacatt tggaatatat ccaaaagcag acgcgtcaac acaaaattcc
120

tcaagtgtac aagataaaca attccaaaaa gttgaagaag taccaaataa ttcagaaaaa
180

gctttggtta aaaaactgta cgatagatac agccaaaata caataaacgg aaaatctaat
240

aaagctagga attgggttta ttcagagaga cctttaaatg aaaatcaagt tcgcatacat
300

ttagaaggta catacagagt tgctgataga gtgtatacac ctaagaggaa cattactctt
360

aataaagaag ttgtcacttt aaaagaattg gatcatatca taagatttgc tcatatttct
420

tatggcttat atatgggaga acatttgcct aaaggtaaca tcgtcataaa tacaaagaat
480

ggcggtaaat atacattaga gtcgcacaaa gagttacaaa agaataggga aaatgtagaa
540

attaatactg atgatataaa aaatgtaact ttcgaacttg tgaaaagtgt taatgacatt
600

gaacaagttt ga
612

<210> 82
<211> 203
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 82

Met Phe Lys Lys Tyr Asp Ser Lys Asn Ser Ile Val Leu Lys Ser Ile
1 5 10 15

Leu Ser Leu Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Thr Phe Gly Ile Tyr Pro Lys
20 25 30

Ala Asp Ala Ser Thr Gln Asn Ser Ser Ser Val Gln Asp Lys Gln Leu
35 40 45

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

Lys Leu Tyr Asp Arg Tyr Ser Lys Asp Thr Ile Asn Gly Lys Ser Asn
65 70 75 80

Lys Ser Arg Asn Trp Val Tyr Ser Glu Arg Pro Leu Asn Glu Asn Gln
85 90 95

Val Arg Ile His Leu Glu Gly Thr Tyr Thr Val Ala Gly Arg Val Tyr
100 105 110

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

Glu Leu Asp His Ile Ile Arg Phe Ala His Ile Ser Tyr Gly Leu Tyr
130 135 140

Met Gly Glu His Leu Pro Lys Gly Asn Ile Val Ile Asn Thr Lys Asp
145 150 155 160

```
Gly Gly Lys Tyr Thr Leu Glu Ser His Lys Glu Leu Gln Lys Asp Arg
                165                 170                 175

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

Leu Val Lys Ser Val Asn Asp Ile Glu Gln Val
        195                 200
```

<210> 83
<211> 203
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 83

```
Met Phe Lys Lys Tyr Asp Ser Lys Asn Ser Ile Val Leu Lys Ser Ile
1               5                   10                  15

Leu Ser Leu Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Thr Phe Gly Ile Tyr Pro Lys
            20                  25                  30

Ala Asp Ala Ser Thr Gln Asn Ser Ser Ser Val Gln Asp Lys Gln Leu
        35                  40                  45

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

Lys Leu Tyr Asp Arg Tyr Ser Lys Asp Thr Ile Asn Gly Lys Ser Asn
65                  70                  75                  80

Lys Ser Arg Asn Trp Val Tyr Ser Glu Arg Pro Leu Asn Glu Asn Gln
                85                  90                  95

Val Arg Ile His Leu Glu Gly Thr Tyr Thr Val Ala Gly Arg Val Tyr
            100                 105                 110

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

Glu Leu Asp His Ile Ile Arg Phe Ala His Ile Ser Tyr Gly Leu Tyr
    130                 135                 140
```

```
Met Gly Glu His Leu Pro Lys Gly Asn Ile Val Ile Asn Thr Lys Asp
145                 150                 155                 160

Gly Gly Lys Tyr Thr Leu Glu Ser His Lys Glu Leu Gln Lys Asp Arg
                165                 170                 175

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

Leu Val Lys Ser Val Asn Asp Ile Glu Gln Val
        195                 200
```

<210> 84
<211> 203
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 84

```
Met Phe Lys Lys Tyr Asp Ser Lys Asn Ser Ile Val Leu Lys Ser Ile
1               5                   10                  15

Leu Ser Leu Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Thr Phe Gly Ile Tyr Pro Lys
            20                  25                  30

Ala Asp Ala Ser Thr Gln Asn Ser Ser Ser Val Gln Asp Lys Gln Leu
        35                  40                  45

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

Lys Leu Tyr Asp Arg Tyr Ser Lys Asp Thr Ile Asn Gly Lys Ser Asn
65                  70                  75                  80

Lys Ser Arg Asn Trp Val Tyr Ser Glu Arg Pro Leu Asn Glu Asn Gln
                85                  90                  95

Val Arg Ile His Leu Glu Gly Thr Tyr Thr Val Ala Gly Arg Val Tyr
            100                 105                 110

Thr Pro Lys Arg Asn Ile Thr Leu Asn Lys Glu Val Val Thr Leu Lys
        115                 120                 125
```

```
Glu Leu Asp His Ile Ile Arg Phe Ala His Ile Ser Tyr Gly Leu Tyr
    130                 135                 140

Met Gly Glu His Leu Pro Lys Gly Asn Ile Val Ile Asn Thr Lys Asp
145                 150                 155                 160

Gly Gly Lys Tyr Thr Leu Glu Ser His Lys Glu Leu Gln Lys Asp Arg
                165                 170                 175

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

Leu Val Lys Ser Val Asn Asp Ile Glu Gln Val
        195                 200
```

<210> 85
<211> 203
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 85

```
Met Phe Lys Lys Tyr Asp Ser Lys Asn Ser Ile Val Leu Lys Ser Ile
1               5                   10                  15

Leu Ser Leu Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Thr Phe Gly Ile Tyr Pro Lys
            20                  25                  30

Ala Asp Ala Ser Thr Gln Asn Ser Ser Ser Val Gln Asp Lys Gln Leu
        35                  40                  45

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

Lys Leu Tyr Asp Arg Tyr Ser Lys Asp Thr Ile Asn Gly Lys Ser Asn
65                  70                  75                  80

Lys Ser Arg Asn Trp Val Tyr Ser Glu Arg Pro Leu Asn Glu Asn Gln
                85                  90                  95

Val Arg Ile His Leu Glu Gly Thr Tyr Thr Val Ala Asp Arg Val Tyr
```

```
            100                 105                 110

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

Glu Leu Asp His Ile Ile Arg Phe Ala His Ile Ser Tyr Gly Leu Tyr
    130                 135                 140

Met Gly Glu His Leu Pro Lys Gly Asn Ile Val Ile Asn Thr Lys Asp
145                 150                 155                 160

Gly Gly Lys Tyr Thr Leu Glu Ser His Lys Glu Leu Gln Lys Asp Arg
                165                 170                 175

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

Leu Val Lys Ser Val Asn Asp Ile Glu Gln Val
        195                 200
```

<210> 86
<211> 203
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 86

```
Met Phe Lys Lys Tyr Asp Ser Lys Asn Ser Ile Val Leu Lys Ser Ile
1               5                   10                  15

Leu Ser Leu Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Thr Phe Gly Ile Tyr Pro Lys
            20                  25                  30

Ala Asp Ala Ser Thr Gln Asn Ser Ser Ser Val Gln Asp Lys Gln Leu
        35                  40                  45

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

Lys Leu Tyr Asp Arg Tyr Ser Lys Asp Thr Ile Asn Gly Lys Ser Asn
65                  70                  75                  80
```

```
Lys Ser Arg Asn Trp Val Tyr Ser Glu Arg Pro Leu Asn Glu Asn Gln
                85                  90                  95

Val Arg Ile His Leu Glu Gly Thr Tyr Thr Val Ala Asp Arg Val Tyr
            100                 105                 110

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

Glu Leu Asp His Ile Ile Arg Phe Ala His Ile Ser Tyr Gly Leu Tyr
    130                 135                 140

Met Gly Glu His Leu Pro Lys Gly Asn Ile Val Ile Asn Thr Lys Asp
145                 150                 155                 160

Gly Gly Lys Tyr Thr Leu Glu Ser His Lys Glu Leu Gln Lys Asp Arg
                165                 170                 175

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

Leu Val Lys Ser Val Asn Asp Ile Glu Gln Val
        195                 200
```

<210> 87
<211> 203
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 87

```
Met Phe Lys Lys Tyr Asp Ser Lys Asn Ser Ile Val Leu Lys Ser Ile
1               5                   10                  15

Leu Ser Leu Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Thr Phe Gly Ile Tyr Pro Lys
            20                  25                  30

Ala Asp Ala Ser Thr Gln Asn Ser Ser Ser Val Gln Asp Lys Gln Leu
        35                  40                  45

Gln Lys Val Glu Glu Val Pro Asn Asn Ser Glu Lys Ala Leu Val Lys
    50                  55                  60
```

```
Lys Leu Tyr Asp Arg Tyr Ser Lys Asp Thr Ile Asn Gly Lys Ser Asn
65                  70                  75                  80

Lys Ser Arg Asn Trp Val Tyr Ser Glu Arg Pro Leu Asn Glu Asn Gln
                85                  90                  95

Val Arg Ile His Leu Glu Gly Thr Tyr Thr Val Ala Asp Arg Val Tyr
            100                 105                 110

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

Glu Leu Asp His Ile Ile Arg Phe Ala His Ile Ser Tyr Gly Leu Tyr
    130                 135                 140

Met Gly Glu His Leu Pro Lys Gly Asn Ile Val Ile Asn Thr Lys Asp
145                 150                 155                 160

Gly Gly Lys Tyr Thr Leu Glu Ser His Lys Glu Leu Gln Lys Asp Arg
                165                 170                 175

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

Leu Val Lys Ser Val Asn Asp Ile Glu Gln Val
        195                 200
```

<210> 88
<211> 203
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 88

```
Met Phe Lys Lys Tyr Asp Ser Lys Asn Ser Ile Val Leu Lys Ser Ile
1               5                   10                  15

Leu Ser Leu Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Thr Phe Gly Ile Tyr Pro Lys
            20                  25                  30

Ala Asp Ala Ser Thr Gln Asn Ser Ser Ser Val Gln Asp Lys Gln Leu
        35                  40                  45
```

```
Gln Lys Val Glu Glu Val Pro Asn Asn Ser Glu Lys Ala Leu Val Lys
    50                  55                  60

Lys Leu Tyr Asp Arg Tyr Ser Lys Asp Thr Ile Asn Gly Lys Ser Asn
65                  70                  75                  80

Lys Ser Arg Asn Trp Val Tyr Ser Glu Arg Pro Leu Asn Glu Asn Gln
                85                  90                  95

Val Arg Ile His Leu Glu Gly Thr Tyr Thr Val Ala Asp Arg Val Tyr
            100                 105                 110

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

Glu Leu Asp His Ile Ile Arg Phe Ala His Ile Ser Tyr Gly Leu Tyr
    130                 135                 140

Met Gly Glu His Leu Pro Lys Gly Asn Ile Val Ile Asn Thr Lys Asp
145                 150                 155                 160

Gly Gly Lys Tyr Thr Leu Glu Ser His Lys Glu Leu Gln Lys Asp Arg
                165                 170                 175

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

Leu Val Lys Ser Val Asn Asp Ile Glu Gln Val
        195                 200
```

<210> 89
<211> 203
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 89

```
Met Phe Lys Lys Tyr Asp Ser Lys Asn Ser Ile Val Leu Lys Ser Ile
1               5                   10                  15

Leu Ser Leu Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Thr Phe Gly Ile Tyr Pro Lys
```

```
            20                  25                  30

Ala Asp Ala Ser Thr Gln Asn Ser Ser Ser Val Gln Asp Lys Gln Leu
        35                  40                  45

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

Lys Leu Tyr Asp Arg Tyr Ser Lys Asp Thr Ile Asn Gly Lys Ser Asn
65                  70                  75                  80

Lys Ser Arg Asn Trp Val Tyr Ser Glu Arg Pro Leu Asn Glu Asn Gln
                85                  90                  95

Val Arg Ile His Leu Glu Gly Thr Tyr Thr Val Ala Asp Arg Val Tyr
            100                 105                 110

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

Glu Leu Asp His Ile Ile Arg Phe Ala His Ile Ser Tyr Gly Leu Tyr
    130                 135                 140

Met Gly Glu His Leu Pro Lys Gly Asn Ile Val Ile Asn Thr Lys Asp
145                 150                 155                 160

Gly Gly Lys Tyr Thr Leu Glu Ser His Lys Glu Leu Gln Lys Asp Arg
                165                 170                 175

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

Leu Val Lys Ser Val Asn Asp Ile Glu Gln Val
        195                 200
```

<210> 90
<211> 203
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 90

```
Met Phe Lys Lys Asn Asp Ser Lys Asn Ser Ile Leu Leu Lys Ser Ile
1               5                  10                  15

Leu Ser Leu Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Thr Phe Gly Ile Tyr Pro Lys
            20                  25                  30

Ala Asp Ala Ser Thr Gln Asn Ser Pro Ser Val Gln Asp Lys Gln Phe
        35                  40                  45

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

Lys Leu Tyr Asp Arg Tyr Ser Gln Asn Thr Ile Asn Gly Lys Ser Asn
65                  70                  75                  80

Lys Ser Arg Asn Trp Val Tyr Ser Glu Arg Pro Leu Asn Glu Asn Gln
                85                  90                  95

Val Arg Ile Asn Leu Glu Gly Thr Tyr Arg Val Ala Asp Arg Val Tyr
            100                 105                 110

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

Glu Leu Asp His Ile Ile Arg Phe Ala His Ile Ser Tyr Gly Leu Tyr
    130                 135                 140

Met Gly Glu His Leu Pro Lys Gly Asn Ile Val Ile Asn Thr Lys Asp
145                 150                 155                 160

Gly Gly Lys Tyr Thr Leu Glu Ser His Lys Glu Leu Gln Lys Asp Arg
                165                 170                 175

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

Leu Val Lys Ser Val Asn Asp Ile Glu Gln Val
        195                 200
```

<210> 91
<211> 203

<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 91

```
Met Phe Lys Lys Tyr Asp Ser Lys Asn Ser Ile Val Leu Lys Ser Ile
1               5                  10                  15

Leu Ser Leu Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Thr Phe Gly Ile Tyr Pro Lys
            20                  25                  30

Ala Asp Ala Ser Thr Gln Asn Ser Ser Ser Val Gln Asp Lys Gln Phe
        35                  40                  45

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

Lys Leu Tyr Asp Arg Tyr Ser Gln Asn Thr Ile Asn Gly Lys Ser Asn
65                  70                  75                  80

Lys Ala Arg Asn Trp Val Tyr Ser Glu Arg Pro Leu Asn Glu Asn Gln
                85                  90                  95

Val Arg Ile His Leu Glu Gly Thr Tyr Arg Val Ala Asp Arg Val Tyr
            100                 105                 110

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

Glu Leu Asp His Ile Ile Arg Phe Ala His Ile Ser Tyr Gly Leu Tyr
    130                 135                 140

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

Gly Gly Lys Tyr Thr Leu Glu Ser His Lys Glu Leu Gln Lys Asn Arg
                165                 170                 175

Glu Asn Val Glu Ile Asn Thr Asp Asp Ile Lys Asn Val Thr Phe Glu
            180                 185                 190

Leu Val Lys Ser Val Asn Asp Ile Glu Gln Val
```

195 200

<210> 92
<211> 203
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

<220>
<221> característica_misc
<222> (5)..(5)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (12)..(12)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (41)..(41)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (48)..(48)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (72)..(73)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (82)..(82)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (100)..(100)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (106)..(106)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc

<222> (109)..(109)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (160)..(160)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (175)..(175)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (180)..(180)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (184)..(184)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (192)..(192)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (201)..(203)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<400> 92

Met Phe Lys Lys Xaa Asp Ser Lys Asn Ser Ile Xaa Leu Lys Ser Ile
1 5 10 15

Leu Ser Leu Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Thr Phe Gly Ile Tyr Pro Lys
20 25 30

Ala Asp Ala Ser Thr Gln Asn Ser Xaa Ser Val Gln Asp Lys Gln Xaa
35 40 45

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

Lys Leu Tyr Asp Arg Tyr Ser Xaa Xaa Thr Ile Asn Gly Lys Ser Asn
65 70 75 80

```
Lys Xaa Arg Asn Trp Val Tyr Ser Glu Arg Pro Leu Asn Glu Asn Gln
               85                  90                  95

Val Arg Ile Xaa Leu Glu Gly Thr Tyr Xaa Val Ala Xaa Arg Val Tyr
            100                 105                 110

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

Glu Leu Asp His Ile Ile Arg Phe Ala His Ile Ser Tyr Gly Leu Tyr
    130                 135                 140

Met Gly Glu His Leu Pro Lys Gly Asn Ile Val Ile Asn Thr Lys Xaa
145                 150                 155                 160

Gly Gly Lys Tyr Thr Leu Glu Ser His Lys Glu Leu Gln Lys Xaa Arg
               165                 170                 175

Glu Asn Val Xaa Ile Asn Thr Xaa Asp Ile Lys Asn Val Thr Phe Xaa
            180                 185                 190

Leu Val Lys Ser Val Asn Asp Ile Xaa Xaa Xaa
        195                 200
```

<210> 93
<211> 14
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 93

```
Gln Asn Thr Ile Asn Gly Lys Ser Asn Lys Ser Arg Asn Trp
1               5                   10
```

<210> 94
<211> 14
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 94

```
Gln Asn Thr Ile Asn Gly Lys Ser Asn Lys Ala Arg Asn Trp
1               5                   10
```

<210> 95
<211> 15
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 95

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

<210> 96
<211> 14
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

<220>
<221> característica_misc
<222> (1)..(2)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (11)..(11)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<400> 96

Xaa Xaa Thr Ile Asn Gly Lys Ser Asn Lys Xaa Arg Asn Trp
1 5 10

<210> 97
<211> 15
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

<220>
<221> característica_misc
<222> (2)..(2)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<400> 97

Lys Xaa Gly Gly Lys Tyr Thr Leu Glu Ser His Lys Glu Leu Gln

1 5 10 15

<210> 98
<211> 1755
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 98
atgacagagt catatccaat tattaaggaa ggctcacaag tcggaagcta ctttctattt
60

ttcatcataa ttgcattttt gttatatgcc aatgtgttat ttattaaacg acgaagttat
120

gagcttgcat tatatcaaac attaggttta tctaaattca acattattta tatactaatg
180

ctcgaacaat tactaatatt tataattacg gcaatattag gtattattat tggtattttt
240

ggttcaaaac tgttattaat gattgtcttt acattattag gaattaaaga aaaggttcca
300

attattttta gtttgagggc ggtatttgaa acattaatgt taatcggtgt cgcttatttt
360

ttaacctctg ctcaaaattt tatattagtg ttcaaacaat ctatttcaca gatgtcaaag
420

aataaccagg ttaaagaaac aaatcataat aaaattacat ttgaagaggt tgttttaggc
480

atcttaggta tagtattgat tatcacagga tactatctat ctttgaacat tgttcaatat
540

tatgattcta tcggtatact tatgtttatt ttattgtcaa ctgtgattgg ggcatactta
600

ttttttaaaa gctctgtttc tctagttttt aaaatggtga agaagtttag aaaaggtgtt
660

ataagtgtaa atgatgtcat gttctcatca tctattatgt atcgtattaa gaaaaatgct
720

ttttcactta cggtcatggc aatcatttca gcgattactg tttcagttct ttgctttgct
780

gctataagta gagcgtcctt atcaagtgaa ataaaatata ctgcaccaca cgacgttaca
840

attaaagacc aacaaaaagc taatcaatta gcaagtgaat taaacaatca aaaaattcct
900

cattttata attataaaga agtaattcat acgaaattgt ataaagataa tttatttgat
960

gtaaaagcga aagaaccata caatgtaaca attactagtg ataaatatat ccctaatact
1020

gatttgaaac gtggacaagc tgatttgttt gtagcggaag gttctatcaa agatttagtg
1080

aaacataaga agcatggtaa ggcaattata ggaacgaaaa aacatcatgt taatattaag
1140

ttacggaaag atattaataa aatctatttt atgacagatg ttgatttagg tggaccaacg
1200

tttgtcttaa atgacaaaga ctatcaagaa ataagaaagt atacaaaagc aaagcatatc
1260

gtctctcaat ttggattcga tttgaaacat aaaaaagatg ctttagcatt agaaaaagtg
1320

aaaaataaag ttgataaatc tattaaaaca agaagtgaag cgataagctc aatatcaagt
1380

ttaaccggaa tattattatt tgtaacatca tttttaggta ttacattctt gattgctgta
1440

tgttgcatta tatacattaa gcaaatagat gaaaccgaag atgagttaga gaattatagt
1500

atattgagaa agcttggatt tacacaaaaa gatatggcaa ggggactaaa gtttaaaatt
1560

atgtttaatt ttgggttacc tttagttatt gcactatcac atgcatattt tacatcatta
1620

gcatatatga aattaatggg tacaacgaat caaataccgg ttttcatagt aatgggatta
1680

tacatttgta tgtatgctgt ttttgcagtg acggcttata atcattccaa gcgaacaatt
1740

agacattcca tataa
1755

<210> 99
<211> 1755
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 99
atgacagagt catatccaat tattaaggaa ggctcacaag tcggaagcta ctttctattt
60

ttcatcataa ttgcattttt gttatatgcc aatgtgttat ttattaaacg acgaagttat
120

gagcttgcat tatatcaaac attaggttta tctaaattca acattattta tatactaatg
180

ctcgaacaat tactaatatt tataattacg gcaatattag gtattattat tggtattttt
240

ggttcaaaac tgttattaat gattgtcttt acattattag gaattaaaga aaaggttcca
300

attattttta gtttgagggc ggtatttgaa acattaatgt taatcggtgt cgcttatttt
360

ttaacctctg ctcaaaattt tatattagtg ttcaaacaat ctatttcaca gatgtcaaag
420

aataaccagg ttaaagaaac aaatcataat aaaattacat ttgaagaggt tgttttaggc
480

atcttaggta tagtattgat tatcacagga tactatctat ctttgaacat tgttcaatat
540

tatgattcta tcggtatact tatgtttatt ttattgtcaa ctgtgattgg ggcatactta
600

ttttttaaaa gctctgtttc tctagttttt aaaatggtga agaagtttag aaaaggtgtt
660

ataagtgtaa atgatgtcat gttctcatca tctattatgt atcgtattaa gaaaaatgct
720

ttttcactta cggtcatggc aatcatttca gcgattactg tttcagttct ttgctttgct
780

gctataagta gagcgtcctt atcaagtgaa ataaaatata ctgcaccaca cgacgttaca
840

attaaagacc aacaaaaagc taatcaatta gcaagtgaat taaacaatca aaaaattcct
900

cattttata attataaaga agtaattcat acgaaattgt ataaagataa tttatttgat
960

gtaaaagcga aagaaccata caatgtaaca attactagtg ataaatatat ccctaatact
1020

gatttgaaac gtggacaagc tgatttgttt gtagcggaag gttctatcaa agatttagtg
1080

aaacataaga agcatggtaa ggcaattata ggaacgaaaa aacatcatgt taatattaag
1140

ttacggaaag atattaataa aatctatttt atgacagatg ttgatttagg tggaccaacg
1200

tttgtcttaa atgacaaaga ctatcaagaa ataagaaagt atacaaaagc aaagcatatc
1260

gtctctcaat ttggattcga tttgaaacat aaaaaagatg ctttagcatt agaaaaagtg
1320

aaaaataaag ttgataaatc tattaaaaca agaagtgaag cgataagctc aatatcaagt
1380

ttaaccggaa tattattatt tgtaacatca tttttaggta ttacattctt gattgctgta
1440

tgttgcatta tatacattaa gcaaatagat gaaaccgaag atgagttaga gaattatagt
1500

atattgagaa agcttggatt tacacaaaaa gatatggcaa ggggactaaa gtttaaaatt
1560

atgtttaatt ttgggttacc tttagttatt gtactatcac atgcatattt tacatcatta
1620

gcatatatga aattaatggg tacaacgaat caaataccgg ttttcatagt aatgggatta
1680

tacatttgta tgtatgctgt ttttgcagtg acggcttata atcattccaa gcgaacaatt
1740

agacattcca tataa
1755

<210> 100
<211> 1755
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 100
atgacagagt catatccaat tattaaggaa ggctcacaag tcggaagcta ctttctattt
60

ttcatcataa ttgcattttt gttatatgcc aatgtgttat ttattaaacg acgaagttat
120

gagcttgcat tatatcaaac attaggttta tctaaattca acattattta tatactaatg
180

ctcgaacaat tactaatatt tataattacg gcaatattag gtattattat tggtattttt
240

ggttcaaaac tgttattaat gattgtcttt acattattag gaattaaaga aaaggttcca
300

attattttta gtttgagggc ggtatttgaa acattaatgt taatcggtgt cgcttatttt
360

ttaacctctg ctcaaaattt tatattagtg ttcaaacaat ctatttcaca gatgtcaaag
420

aataaccagg ttaaagaaac aaatcataat aaaattacat ttgaagaggt tgttttaggc
480

atcttaggta tagtattgat taccacagga tactatctat ctttgaacat tgttcaatat
540

tatgattcta tcggtatact tatgtttatt ttattgtcaa ctgtgattgg ggcatactta
600

ttttttaaaa gctctgtttc tctagttttt aaaatggtga agaagtttag aaaaggtgtt
660

ataagtgtaa atgatgtcat gttctcatca tctattatgt atcgtattaa gaaaaatgct
720

ttttcactta cggtcatggc aatcatttca gcgattactg tttcagttct ttgctttgct
780

gctataagta gagcgtcctt atcaagtgaa ataaaatata ctgcaccaca cgacgttaca
840

attaaagacc aacaaaaagc taatcaatta gcaagtgaat taaacaatca aaaaattcct
900

catttttata attataaaga agtaattcat acgaaattgt ataaagataa tttatttgat
960

gtaaaagcga aagaaccata caatgtaaca attactagtg ataaatatat ccctaatact
1020

gatttgaaac gtggacaagc tgatttgttt gtagcggaag gttctatcaa agatttagtg
1080

aaacataaga agcatggtaa ggcaattata ggaacgaaaa aacatcatgt taatattaag
1140

ttacggaaag atattaataa aatctatttt atgacagatg ttgatttagg tggaccaacg
1200

tttgtcttaa atgacaaaga ctatcaagaa ataagaaagt atacaaaagc aaagcatatc
1260

gtctctcaat ttggattcga tttgaaacat aaaaaagatg ctttagcatt agaaaaagtg
1320

aaaaataaag ttgataaatc tattaaaaca agaagtgaag cgataagctc aatatcaagt
1380

ttaaccggaa tattattatt tgtaacatca tttttaggta ttacattctt gattgctgta
1440

tgttgcatta tatacattaa gcaaatagat gaaaccgaag atgagttaga gaattatagt
1500

atattgagaa agcttggatt tacacaaaaa gatatggcaa ggggactaaa gtttaaaatt
1560

atgtttaatt ttgggttacc tttagttatt gcactatcac atgcatattt tacatcatta
1620

gcatatatga aattaatggg tacaacgaat caaataccgg ttttcatagt aatgggatta
1680

tacatttgta tgtatgctgt ttttgcagtg acggcttata atcattccaa gcgaacaatt
1740

agacattcca tataa
1755

<210> 101
<211> 1840
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 101
atgaccttta acgagataat atttaaaaat ttccgtcaaa atttatcaca gctttgtagc
60

attaaaatac gcgcataaac taaacatgac agagtcatat ccaattatta aggaaggctc
120

acaagtcgga agctactttc tatttttcat cataattgca tttttgttat atgccaatgt
180

gttatttatt aaacgacgaa gttatgagct tgcattatat caaacattag gtttatctaa
240

attcaacatt atttatatac taatgctcga acaattacta atatttataa ttacggcaat
300

attaggtatt attattggta tttttggttc aaaactgtta ttaatgattg tctttacatt
360

attaggaatt aaagaaaagg ttccaattat ttttagtttg agggcggtat ttgaaacatt
420

aatgttaatc ggtgtcgctt atttttaac ctctgctcaa aattttatat tagtgttcaa
480

acaatctatt tcacagatgt caaagaataa ccaggttaaa gaaacaaatc ataataaaat
540

tacatttgaa gaggttgttt taggcatctt aggtatagta ttgattacca caggatacta
600

tctatctttg aacattgttc aatattatga ttctatcggt atacttatgt ttattttatt
660

gtcaactgtg attggggcat acttatttt taaaagctct gtttctctag tttttaaaat
720

ggtgaagaag tttagaaaag gtgttataag tgtaaatgat gtcatgttct catcatctat
780

tatgtatcgt attaagaaaa atgctttttc acttacggtc atggcaatca tttcagcgat
840

tactgtttca gttctttgct ttgctgctat aagtagagcg tccttatcaa gtgaaataaa
900

atatactgca ccacacgacg ttacaattaa agaccaacaa aaagctaatc aattagcaag
960

tgaattaaac aatcaaaaaa ttcctcattt ttataattat aaagaagtaa ttcatacgaa
1020

attgtataaa gataatttat ttgatgtaaa agcgaaagaa ccatacaatg taacaattac
1080

tagtgataaa tatatcccta atactgattt gaaacgtgga caagctgatt tgtttgtagc
1140

ggaaggttct atcaaagatt tagtgaaaca taagaagcat ggtaaggcaa ttataggaac
1200

gaaaaaacat catgttaata ttaagttacg gaaagatatt aataaaatct attttatgac
1260

agatgttgat ttaggtggac caacgtttgt cttaaatgac aaagactatc aagaaataag
1320

aaagtataca aaagcaaagc atatcgtctc tcaatttgga ttcgatttga aacataaaaa
1380

agatgcttta gcattagaaa aagtgaaaaa taaagttgat aaatctatta aaacaagaag
1440

tgaagcgata agctcaatat caagtttaac cggaatatta ttatttgtaa catcattttt
1500

aggtattaca ttcttgattg ctgtatgttg cattatatac attaagcaaa tagatgaaac
1560

cgaagatgag ttagagaatt atagtatatt gagaaagctt ggatttacac aaaaagatat
1620

ggcaagggga ctaaagttta aaattatgtt taattttggg ttacctttag ttattgcact
1680

atcacatgca tattttacat cattagcata tatgaaatta atgggtacaa cgaatcaaat
1740

accggttttc atagtaatgg gattatacat ttgtatgtat gctgtttttg cagtgacggc
1800

ttataatcat tccaagcgaa caattagaca ttccatataa
1840

<210> 102
<211> 1890
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 102
atgaccttta acgagataat atttaaaaat ttccgtcaaa atttatcaca ttatgccatc
60

tatctttttt cattaattac gagtgtagta ttgtatttta gctttgtagc attaaaatac
120

gcgcataaac taaacatgac agagtcatat ccaattatta aggaaggctc acaagtcgga
180

agctactttc tatttttcat cataattgca tttttgttat atgccaatgt gttatttatt
240

aaacgacgaa gttatgagct tgcattatat caaacattag gtttatctaa attcaacatt
300

atttatatac taatgctcga acaattacta atatttataa ttacggcaat attaggtatt
360

attattggta tttttggttc aaaactgtta ttaatgattg tctttacatt attaggaatt
420

aaagaaaagg ttccaattat ttttagtttg agggcggtat ttgaaacatt aatgttaatc
480

ggtgtcgctt atttttaac ctctgctcaa aattttatat tagtgttcaa acaatctatt
540

tcacagatgt caaagaataa ccaggttaaa gaaacaaatc ataataaaat tacatttgaa
600

gaggttgttt taggcatctt aggtatagta ttgattacca caggatacta tctatctttg
660

aacattgttc aatattatga ttctatcggt atacttatgt ttattttatt gtcaactgtg
720

attggggcat acttattttt taaaagctct gtttctctag tttttaaaat ggtgaagaag
780

tttagaaaag gtgttataag tgtaaatgat gtcatgttct catcatctat tatgtatcgt
840

attaagaaaa atgctttttc acttacggtc atggcaatca tttcagcgat tactgtttca
900

gttctttgct ttgctgctat aagtagagcg tccttatcaa gtgaaataaa atatactgca
960

ccacacgacg ttacaattaa agaccaacaa aaagctaatc aattagcaag tgaattaaac
1020

aatcaaaaaa ttcctcattt ttataattat aaagaagtaa ttcatacgaa attgtataaa
1080

gataatttat ttgatgtaaa agcgaaagaa ccatacaatg taacaattac tagtgataaa
1140

tatatcccta atactgattt gaaacgtgga caagctgatt tgtttgtagc ggaaggttct
1200

atcaaagatt tagtgaaaca taagaagcat ggtaaggcaa ttataggaac gaaaaaacat
1260

catgttaata ttaagttacg gaaagatatt aataaaatct attttatgac agatgttgat
1320

ttaggtggac caacgtttgt cttaaatgac aaagactatc aagaaataag aaagtataca
1380

aaagcaaagc atatcgtctc tcaatttgga ttcgatttga aacataaaaa agatgcttta
1440

gcattagaaa aagtgaaaaa taaagttgat aaatctatta aaacaagaag tgaagcgata
1500

agctcaatat caagtttaac cggaatatta ttatttgtaa catcattttt aggtattaca
1560

ttcttgattg ctgtatgttg cattatatac attaagcaaa tagatgaaac cgaagatgag
1620

ttagagaatt atagtatatt gagaaagctt ggatttacac aaaaagatat ggcaagggga
1680

ctaaagttta aaattatgtt taattttggg ttacctttag ttattgcact atcacatgca
1740

tattttacat cattagcata tatgaaatta atgggtacaa cgaatcaaat accggttttc
1800

atagtaatgg gattatacat ttgtatgtat gctgtttttg cagtgacggc ttataatcat
1860

tccaagcgaa caattagaca ttccatataa
1890

<210> 103
<211> 1890
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 103
atgaccttta acgagataat atttaaaaat ttccgtcaaa atttatcaca ttatgccatc
60

tatctttttt cattaattac gagtgtagta ttgtatttta gctttgtagc attaaaatac
120

gcgcataaac taaacatgac agagtcatat ccaattatta aggaaggctc acaagtcgga
180

agctactttc tatttttcat cataattgca tttttgttat atgccaatgt gttatttatt
240

aaacgacgaa gttatgagct tgcattatat caaacattag gtttatctaa attcaacatt
300

atttatatac taatgctcga acaattacta atatttataa ttacggcaat attaggtatt
360

attattggta tttttggttc aaaactgtta ttaatgattg tctttacatt attaggaatt
420

aaagaaaagg ttccaattat ttttagtttg agggcggtat ttgaaacatt aatgttaatc
480

ggtgtcgctt atttttaac ctctgctcaa aattttatat tagtgttcaa acaatctatt
540

tcacagatgt caaagaataa ccaggttaaa gaaacaaatc ataataaaat tacatttgaa
600

gaggttgttt taggcatctt aggtatagta ttgattacca caggatacta tctatctttg
660

aacattgttc aatattatga ttctatcggt atacttatgt ttattttatt gtcaactgtg
720

attggggcat acttattttt taaaagctct gtttctctag tttttaaaat ggtgaagaag
780

tttagaaaag gtgttataag tgtaaatgat gtcatgttct catcatctat tatgtatcgt
840

attaagaaaa atgctttttc acttacggtc atggcaatca tttcagcgat tactgtttca
900

gttctttgct ttgctgctat aagtagagcg tccttatcaa gtgaaataaa atatactgca
960

ccacacgacg ttacaattaa agaccaacaa aaagctaatc aattagcaag tgaattaaac
1020

aatcaaaaaa ttcctcattt ttataattat aaagaagtaa ttcatacgaa attgtataaa
1080

gataatttat ttgatgtaaa agcgaaagaa ccatacaatg taacaattac tagtgataaa
1140

tatatcccta atactgattt gaaacgtgga caagctgatt tgtttgtagc ggaaggttct
1200

atcaaagatt tagtgaaaca taagaagcat ggtaaagcag ttataggaac gaaaaaacat
1260

catgttaata ttaagttgcg gaaagatatt aataaaatct attttatgac agatgttgat
1320

ttaggtggac caacgtttgt cttaaatgac aaagactatc aagaaataag aaagtataca
1380

aaagcaaagc atatcgtctc tcaatttgga ttcgatttga aacataaaaa agatgcttta
1440

gcattagaaa aagtgaaaaa taaagttgat aaatctatta aaacaagaag tgaagcgata
1500

agctcaatat caagtttaac cggaatatta ttatttgtaa catcattttt aggtattaca
1560

ttcttgattg ctgtatgttg cattatatac ataaagcaaa tagatgaaac cgaagatgag
1620

ttagagaatt atagtatttt gagaaagctt ggatttacac aaaaagatat ggcaagggga
1680

ctaaagttta aaattatgtt taattttggg ttacctttag ttattgcact atcacatgca
1740

tattttacat cattagcata tatgaaatta atgggtacaa cgaatcaaat accggttttc
1800

atagtaatgg gattatacat ttgtatgtat gctgtttttg cagtgacggc ttataatcat
1860

tccaagcgaa caattagaca ttccatataa
1890

<210> 104
<211> 1890
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 104
atgaccttta acgagataat atttaaaaat ttccgtcaaa atttatcaca ttatgccatc
60

tatctttttt cattaattac gagtgtagta ttgtatttta gctttgtagc attaaaatac
120

gcgcataaac taaacatgac agagtcatat ccaattatta aggaaggctc acaagtcgga
180

agctactttc tatttttcat cataattgca tttttgttat atgccaatgt gttatttatt
240

aaacgacgaa gttatgagct tgcattatat caaacattag gtttatctaa attcaacatt
300

atttatatac taatgctcga acaattacta atatttataa ttacggcaat attaggtatt
360

attattggta tttttggttc aaaactgtta ttaatgattg tctttacatt attaggaatt
420

aaagaaaagg ttccaattat ttttagtttg agggcggtat ttgaaacatt aatgttaatc
480

ggtgtcgctt atttttaac ctctgctcaa aattttatat tagtgttcaa acaatctatt
540

tcacagatgt caaagaataa ccaggttaaa gaaacaaatc ataataaaat tacatttgaa
600

gaggttgttt taggcatctt aggtatagta ttgattacca caggatacta tctatctttg
660

aacattgttc aatattatga ttctatcggt atacttatgt ttatttttatt gtcaactgtg
720

attggggcat acttattttt taaaagctct gtttctctag tttttaaaat ggtgaagaag
780

tttagaaaag gtgttataag tgtaaatgat gtcatgttct catcatctat tatgtatcgt
840

attaagaaaa atgctttttc acttacggtc atggcaatca tttcagcgat tactgtttca
900

gttctttgct ttgctgctat aagtagagcg tccttatcaa gtgaaataaa atatactgca
960

ccacacgacg ttacaattaa agaccaacaa aaagctaatc aattagcaag tgaattaaac
1020

aatcaaaaaa ttcctcattt ttataattat aaagaagtaa ttcatacgaa attgtataaa
1080

gataatttat ttgatgtaaa agcgaaagaa ccatacaatg taacaattac tagtgataaa
1140

tatatcccta atactgattt gaaacgtgga caagctgatt tgtttgtagc ggaaggttct
1200

atcaaagatt tagtgaaaca taagaagcat ggtaaagcag ttataggaac gaaaaaacat
1260

catgttaata ttaagttgcg gaaagatatt aataaaatct attttatgac agatgttgat
1320

ttaggtggac caacgtttgt cttaaatgac aaagactatc aagaaataag aaagtataca
1380

aaagcaaagc atatcgtctc tcaatttgga ttcgatttga aacataaaaa agatgcttta
1440

gcattagaaa aagtgaaaaa taaagttgat aaatctatta aaacaagaag tgaagcgata
1500

agctcaatat caagtttaac cggaatatta ttatttgtaa catcattttt aggtattaca
1560

ttcttgattg ctgtatgttg cattatatac ataaagcaaa tagatgaaac cgaagatgag
1620

ttagagaatt atagtatttt gagaaagctt ggatttacac aaaaagatat ggcaagggga
1680

ctaaagttta aaattatgtt taattttggg ttacctttag ttattgcact atcacatgca
1740

tattttacat cattagcata tatgaaatta atgggtacaa cgaatcaaat accggttttc
1800

atagtaatgg gattatacat ttgtatgtat gctgtttttg cagtgacggc ttataatcat
1860

tccaagcgaa caattagaca ttccatataa
1890

<210> 105
<211> 1890
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 105
atgaccttta acgagataat atttaaaaat ttccgtcaaa atttatcaca ttatgccatc
60

tatctttttt cgttaattac gagtgtagta ttgtatttta gctttgtagc attaaaatac
120

gctcataaac taaacatgac agagtcatat ccaattataa aggaaggctc acaagtcgga
180

agctactttc tatttttcat cataattgca tttttgttat atgccaatgt gttatttatt
240

aaacgacgaa gttatgagct tgcattatat caaacattag gtttatctaa attcaacatt
300

atttatatac taatgctcga acaattacta atatttataa ttacggcaat attaggtatt
360

attattggta tttttggttc gaaactgtta ttaatgattg tctttacatt attaggaatt
420

aaagaaaagg ttccaattat ttttagtttg agggcggtat ttgaaacatt aatgttaatc
480

ggtgtcgctt atttttaac atctgctcaa aattttatat tagtgttcaa acaatctatt
540

tcacagatgt caaagaataa ccaggttaaa gaaacaaatc ataataaaat tacatttgaa
600

gaggttgttt taggcatctt aggtatagta ttgattacca caggatacta tctatctttg
660

aacattgttc aatattatga ttctatcggt acacttatgt ttattttatt gtcaactgtg
720

attggggcat acttattttt taaaagctct gtttctctag tttttaaaat ggtgaagaag
780

tttagaaaag gtgttataag tgtaaatgat gtcatgttct catcatctat tatgtatcgt
840

attaagaaaa atgctttttc acttacggtc atggcaatca tttcagcgat tactgtttca
900

gttctttgct ttgctgctat aagtagagcg tccttatcaa gtgaaataaa atatactgca
960

ccacacgacg ttacaattaa agaccaacaa aaagctaatc aattagcaag tgaattaaac
1020

aatcaaaaaa ttcctcattt ttataattat aaagaagtaa ttcatacgaa attgtataaa
1080

gataatttat ttgatgtaaa agcgaaagaa ccatacaatg taacaattac tagtgataaa
1140

tacatcccta atactgattt gaaacgtggg caagctgatt tatttgtagc ggaaggttct
1200

atcaaagatt tagtgaaaca taagaagcat ggtaaggcaa ttataggaac gaaaaaacat
1260

catgttaata ttaagttacg taaagatatt aataaaatct attttatgac agatgttgat
1320

ttaggtggac caacgtttgt cttaaatgac aaagactatc aagaaataag aaagtataca
1380

aaggcaaagc atatcgtctc tcaatttgga ttcgatttga aacataaaaa agatgcttta
1440

gcattagaaa aagcgaaaaa taaagttgat aaatctattg aaacaagaag tgaagcgata
1500

agctcaatat caagtttaac cggaatatta ttatttgtaa catcattttt aggtattaca
1560

ttcttgattg ctgtatgttg cattatatac ataaagcaaa tagatgaaac cgaagatgag
1620

ttagagaatt atagtatttt gagaaagctt ggatttacac aaaaagatat ggcaagggga
1680

ctaaagttta aaattatgtt taattttggg ttacctttag ttattgcact atcacatgca
1740

tattttacat cattagcata tatgaaatta atgggtacaa cgaatcaaat accggttttc
1800

atagtaatgg gattatacat ttgtatgtat gctgtttttg cagtgacggc ttataatcat
1860

tccaagcgaa caattagaca ttccatataa
1890

<210> 106

<211> 1800
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 106
ttgtatttta gctttgtagc attaaaatac gctcataaac taaacatgac agagtcatat
60

ccaattataa aggaaggctc acaagtcgga agctactttc tatttttcat cataattgca
120

tttttgttat atgccaatgt gttatttatt aaacgacgaa gttatgagct tgcattatat
180

caaacattag gtttatctaa attcaacatt atttatatac taatgctcga acaattacta
240

atatttataa ttacggcaat attaggtatt attattggta tttttggttc gaaactgtta
300

ttaatgattg tctttacatt attaggaatt aaagaaaagg ttccaattat ttttagtttg
360

agggcggtat ttgaaacatt aatgttaatc ggtgtcgctt atttttaac atctgctcaa
420

aattttatat tagtgttcaa acaatctatt tcacagatgt caaagaataa ccaggttaaa
480

gaaacaaatc ataataaaat tacatttgaa gaggttgttt taggcatctt aggtatagta
540

ttgattacca caggatacta tctatctttg aacattgttc aatattatga ttctatcggt
600

acacttatgt ttattttatt gtcaactgtg attggggcat acttattttt taaaagctct
660

gtttctctag tttttaaaat ggtgaagaag tttagaaaag gtgttataag tgtaaatgat
720

gtcatgttct catcatctat tatgtatcgt attaagaaaa atgctttttc acttacggtc
780

atggcaatca tttcagcgat tactgtttca gttctttgct ttgctgctat aagtagagcg
840

tccttatcaa gtgaaataaa atatactgca ccacacgacg ttacaattaa agaccaacaa
900

aaagctaatc aattagcaag tgaattaaac aatcaaaaaa ttcctcattt ttataattat
960

aaagaagtaa ttcatacgaa attgtataaa gataatttat ttgatgtaaa agcgaaagaa
1020

ccatacaatg taacaattac tagtgataaa tacatcccta atactgattt gaaacgtggg
1080

caagctgatt tatttgtagc ggaaggttct atcaaagatt tagtgaaaca taagaagcat
1140

ggtaaggcaa ttataggaac gaaaaaacat catgttaata ttaagttacg taaagatatt
1200

aataaaatct attttatgac agatgttgat ttaggtggac caacgtttgt cttaaatgac
1260

aaagactatc aagaaataag aaagtataca aaggcaaagc atatcgtctc tcaatttgga
1320

ttcgatttga aacataaaaa agatgcttta gcattagaaa aagcgaaaaa taaagttgat
1380

aaatctattg aaacaagaag tgaagcgata agctcaatat caagtttaac cggaatatta
1440

ttatttgtaa catcattttt aggtattaca ttcttgattg ctgtatgttg cattatatac
1500

ataaagcaaa tagatgaaac cgaagatgag ttagagaatt atagtatttt gagaaagctt
1560

ggatttacac aaaaagatat ggcaagggga ctaaagttta aaattatgtt taattttggg
1620

ttacctttag ttattgcact atcacatgca tattttacat cattagcata tatgaaatta
1680

atgggtacaa cgaatcaaat accggttttc atagtaatgg gattatacat ttgtatgtat
1740

gctgtttttg cagtgacggc ttataatcat tccaagcgaa caattagaca ttccatataa
1800

<210> 107
<211> 1755
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 107
atgacagagt catatccaat tataaaggaa ggctcacaag tcggaagcta ctttctattt
60

ttcatcataa ttgcattttt gttatatgcc aatgtgttat ttattaaacg acgaagttat
120

gagcttgcat tatatcaaac attaggttta tctaaattca acattattta tatactaatg
180

ctcgaacaat tactaatatt tataattacg gcaatattag gtattattat tggtattttt
240

ggttcgaaac tgttattaat gattgtcttt acattattag gaattaaaga aaaggttcca
300

attattttta gtttgagggc ggtatttgaa acattaatgt taatcggtgt cgcttatttt
360

ttaacatctg ctcaaaattt tatattagtg ttcaaacaat ctatttcaca gatgtcaaag
420

aataaccagg ttaaagaaac aaatcataat aaaattacat ttgaagaggt tgttttaggc
480

atcttaggta tagtattgat taccacagga tactatctat ctttgaacat tgttcaatat
540

tatgattcta tcggtacact tatgtttatt ttattgtcaa ctgtgattgg ggcatactta
600

ttttttaaaa gctctgtttc tctagttttt aaaatggtga agaagtttag aaaaggtgtt
660

ataagtgtaa atgatgtcat gttctcatca tctattatgt atcgtattaa gaaaaatgct
720

ttttcactta cggtcatggc aatcatttca gcgattactg tttcagttct ttgctttgct
780

gctataagta gagcgtcctt atcaagtgaa ataaaatata ctgcaccaca cgacgttaca
840

attaaagacc aacaaaaagc taatcaatta gcaagtgaat taaacaatca aaaaattcct
900

catttttata attataaaga agtaattcat acgaaattgt ataaagataa tttatttgat
960

gtaaaagcga aagaaccata caatgtaaca attactagtg ataaatacat ccctaatact
1020

gatttgaaac gtgggcaagc tgatttattt gtagcggaag gttctatcaa agatttagtg
1080

aaacataaga agcatggtaa ggcaattata ggaacgaaaa aacatcatgt taatattaag
1140

ttacgtaaag atattaataa aatctatttt atgacagatg ttgatttagg tggaccaacg
1200

tttgtcttaa atgacaaaga ctatcaagaa ataagaaagt atacaaaggc aaagcatatc
1260

gtctctcaat ttggattcga tttgaaacat aaaaaagatg ctttagcatt agaaaaagcg
1320

aaaaataaag ttgataaatc tattgaaaca agaagtgaag cgataagctc aatatcaagt
1380

ttaaccggaa tattattatt tgtaacatca tttttaggta ttacattctt gattgctgta
1440

tgttgcatta tatacataaa gcaaatagat gaaaccgaag atgagttaga gaattatagt
1500

attttgagaa agcttggatt tacacaaaaa gatatggcaa ggggactaaa gtttaaaatt
1560

atgtttaatt ttgggttacc tttagttatt gcactatcac atgcatattt tacatcatta
1620

gcatatatga aattaatggg tacaacgaat caaataccgg ttttcatagt aatgggatta
1680

tacatttgta tgtatgctgt ttttgcagtg acggcttata atcattccaa gcgaacaatt
1740

agacattcca tataa
1755

<210> 108
<211> 1890
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 108
atgaccttta acgagataat atttaaaaat ttccgtcaaa atttatcaca ttatgccatc
60

tatctttttt cattaattac gagtgtagta ttgtatttta gctttgtagc attaaaatac
120

gctcataaac taaacatgac agagtcatat ccaattataa aggaaggctc acaagtcgga
180

agctactttc tatttttcat cataattgca tttttgttat atgccaatgt gttatttatt
240

aaacgacgaa gttatgagct tgcattatat caaacattag gtttatctaa attcaacatt
300

atttatatac taatgctcga acaattacta atatttataa ttacggcaat attaggtatt
360

attattggta tttttggttc gaaactgtta ttaatgattg tctttacatt attaggaatt
420

aaagaaaagg ttccaattat ttttagtttg agggcggtat ttgaaacatt aatgttaatc
480

ggtgtcgctt atttttttaac atctgctcaa aattttatat tagtgttcaa acaatctatt
540

tcacagatgt caaagaataa ccaggttaaa gaaacaaatc ataataaaat tacatttgaa
600

gaggttgttt taggcatctt aggtatagta ttgattacca caggatacta tctatctttg
660

aacattgttc aatattatga ttctatcggt acacttatgt ttattttatt gtcaactgtg
720

attggggcat acttattttt taaaagctct gtttctctag tttttaaaat ggtgaagaag
780

tttagaaaag gtgttataag tgtaaatgat gtcatgttct catcatctat tatgtatcgt
840

attaagaaaa atgctttttc acttacggtc atggcaatca tttcagcgat tactgtttca
900

gttctttgct ttgctgctat aagtagagcg tccttatcaa gtgaaataaa atatactgca
960

ccacacgacg ttacaattaa agaccaacaa aaagctaatc aattagcaag tgaattaaac
1020

aatcaaaaaa ttcctcattt ttataattat aaagaagtaa ttcatacgaa attgtataaa
1080

gataatttat ttgatgtaaa atcgaaacaa ccatacaatg taacaattac tagtgataaa
1140

tacatcccta gtactgattt gaaacgtggg caagctgatt tgtttgtagc ggaaggttct
1200

atcaaagatt tagtgaaaca taagaagcat ggtaaagcag ttataggaac gaaaaaacat
1260

catgttaata ttaagttacg taaagatatt aataaaatct attttatgac agatgttgat
1320

ttaggtggac caacgtttgt cttaaatgac aaagactatc aagaaataag aaagtataca
1380

aaggcaaagc atatcgtctc tcaatttgga ttcgatttga aacataaaaa agatgcttta
1440

gcattagaaa aagcgaaaaa taaagttgat aaatctattg agacaagaag tgaagcgata
1500

agctcaatat caagtttaac cggaatatta ttatttgtaa catcattttt aggtattaca
1560

ttcttgattg ctgtatgttg cattatatac attaagcaaa tagatgaaac cgaagatgag
1620

ttagagaatt atagtatatt gagaaagctt ggatttacac aaaaagatat ggcaagggga
1680

ctaaagttta aaattatgtt taattttggg ttacctttag ttattgcact atcacatgca
1740

tattttacat cattagcata tatgaaatta atgggtacaa cgaatcaaat accggttttc
1800

atagtaatgg gattatacat ttgtatgtat gctgtttttg cagtgacggc ttataatcat
1860

tccaagcgaa caattagaca ttccatataa
1890

<210> 109
<211> 629
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 109

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

His Tyr Ala Ile Tyr Leu Phe Ser Leu Ile Thr Ser Val Val Leu Tyr
20 25 30

Phe Ser Phe Val Ala Leu Lys Tyr Ala His Lys Leu Asn Met Thr Glu
35 40 45

Ser Tyr Pro Ile Ile Lys Glu Gly Ser Gln Val Gly Ser Tyr Phe Leu
50 55 60

Phe Phe Ile Ile Ile Ala Phe Leu Leu Tyr Ala Asn Val Leu Phe Ile
65 70 75 80

```
Lys Arg Arg Ser Tyr Glu Leu Ala Leu Tyr Gln Thr Leu Gly Leu Ser
                85                  90                  95

Lys Phe Asn Ile Ile Tyr Ile Leu Met Leu Glu Gln Leu Leu Ile Phe
            100                 105                 110

Ile Ile Thr Ala Ile Leu Gly Ile Ile Ile Gly Ile Phe Gly Ser Lys
        115                 120                 125

Leu Leu Leu Met Ile Val Phe Thr Leu Leu Gly Ile Lys Glu Lys Val
    130                 135                 140

Pro Ile Ile Phe Ser Leu Arg Ala Val Phe Glu Thr Leu Met Leu Ile
145                 150                 155                 160

Gly Val Ala Tyr Phe Leu Thr Ser Ala Gln Asn Phe Ile Leu Val Phe
                165                 170                 175

Lys Gln Ser Ile Ser Gln Met Ser Lys Asn Asn Gln Val Lys Glu Thr
            180                 185                 190

Asn His Asn Lys Ile Thr Phe Glu Glu Val Val Leu Gly Ile Leu Gly
        195                 200                 205

Ile Val Leu Ile Thr Thr Gly Tyr Tyr Leu Ser Leu Asn Ile Val Gln
    210                 215                 220

Tyr Tyr Asp Ser Ile Gly Thr Leu Met Phe Ile Leu Leu Ser Thr Val
225                 230                 235                 240

Ile Gly Ala Tyr Leu Phe Phe Lys Ser Ser Val Ser Leu Val Phe Lys
                245                 250                 255

Met Val Lys Lys Phe Arg Lys Gly Val Ile Ser Val Asn Asp Val Met
            260                 265                 270

Phe Ser Ser Ser Ile Met Tyr Arg Ile Lys Lys Asn Ala Phe Ser Leu
        275                 280                 285

Thr Val Met Ala Ile Ile Ser Ala Ile Thr Val Ser Val Leu Cys Phe
```

```
    290                 295                 300

Ala Ala Ile Ser Arg Ala Ser Leu Ser Ser Glu Ile Lys Tyr Thr Ala
305                 310                 315                 320

Pro His Asp Val Thr Ile Lys Asp Gln Gln Lys Ala Asn Gln Leu Ala
                325                 330                 335

Ser Glu Leu Asn Asn Gln Lys Ile Pro His Phe Tyr Asn Tyr Lys Glu
            340                 345                 350

Val Ile His Thr Lys Leu Tyr Lys Asp Asn Leu Phe Asp Val Lys Ala
        355                 360                 365

Lys Glu Pro Tyr Asn Val Thr Ile Thr Ser Asp Lys Tyr Ile Pro Asn
    370                 375                 380

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

Ile Lys Asp Leu Val Lys His Lys Lys His Gly Lys Ala Ile Ile Gly
                405                 410                 415

Thr Lys Lys His His Val Asn Ile Lys Leu Arg Lys Asp Ile Asn Lys
            420                 425                 430

Ile Tyr Phe Met Thr Asp Val Asp Leu Gly Gly Pro Thr Phe Val Leu
        435                 440                 445

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

Ile Val Ser Gln Phe Gly Phe Asp Leu Lys His Lys Lys Asp Ala Leu
465                 470                 475                 480

Ala Leu Glu Lys Ala Lys Asn Lys Val Asp Lys Ser Ile Glu Thr Arg
                485                 490                 495

Ser Glu Ala Ile Ser Ser Ile Ser Ser Leu Thr Gly Ile Leu Leu Phe
            500                 505                 510
```

```
Val Thr Ser Phe Leu Gly Ile Thr Phe Leu Ile Ala Val Cys Cys Ile
        515                 520                 525

Ile Tyr Ile Lys Gln Ile Asp Glu Thr Glu Asp Glu Leu Glu Asn Tyr
    530                 535                 540

Ser Ile Leu Arg Lys Leu Gly Phe Thr Gln Lys Asp Met Ala Arg Gly
545                 550                 555                 560

Leu Lys Phe Lys Ile Met Phe Asn Phe Gly Leu Pro Leu Val Ile Ala
                565                 570                 575

Leu Ser His Ala Tyr Phe Thr Ser Leu Ala Tyr Met Lys Leu Met Gly
            580                 585                 590

Thr Thr Asn Gln Ile Pro Val Phe Ile Val Met Gly Leu Tyr Ile Cys
        595                 600                 605

Met Tyr Ala Val Phe Ala Val Thr Ala Tyr Asn His Ser Lys Arg Thr
    610                 615                 620

Ile Arg His Ser Ile
625
```

<210> 110
<211> 599
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 110

```
Met Tyr Phe Ser Phe Val Ala Leu Lys Tyr Ala His Lys Leu Asn Met
1               5                   10                  15

Thr Glu Ser Tyr Pro Ile Ile Lys Glu Gly Ser Gln Val Gly Ser Tyr
            20                  25                  30

Phe Leu Phe Phe Ile Ile Ile Ala Phe Leu Leu Tyr Ala Asn Val Leu
        35                  40                  45

Phe Ile Lys Arg Arg Ser Tyr Glu Leu Ala Leu Tyr Gln Thr Leu Gly
    50                  55                  60
```

```
Leu Ser Lys Phe Asn Ile Ile Tyr Ile Leu Met Leu Glu Gln Leu Leu
65                  70                  75                  80

Ile Phe Ile Ile Thr Ala Ile Leu Gly Ile Ile Ile Gly Ile Phe Gly
                85                  90                  95

Ser Lys Leu Leu Leu Met Ile Val Phe Thr Leu Leu Gly Ile Lys Glu
            100                 105                 110

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

Leu Ile Gly Val Ala Tyr Phe Leu Thr Ser Ala Gln Asn Phe Ile Leu
    130                 135                 140

Val Phe Lys Gln Ser Ile Ser Gln Met Ser Lys Asn Asn Gln Val Lys
145                 150                 155                 160

Glu Thr Asn His Asn Lys Ile Thr Phe Glu Glu Val Val Leu Gly Ile
                165                 170                 175

Leu Gly Ile Val Leu Ile Thr Thr Gly Tyr Tyr Leu Ser Leu Asn Ile
            180                 185                 190

Val Gln Tyr Tyr Asp Ser Ile Gly Thr Leu Met Phe Ile Leu Leu Ser
        195                 200                 205

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

Phe Lys Met Val Lys Lys Phe Arg Lys Gly Val Ile Ser Val Asn Asp
225                 230                 235                 240

Val Met Phe Ser Ser Ser Ile Met Tyr Arg Ile Lys Lys Asn Ala Phe
                245                 250                 255

Ser Leu Thr Val Met Ala Ile Ile Ser Ala Ile Thr Val Ser Val Leu
            260                 265                 270
```

```
Cys Phe Ala Ala Ile Ser Arg Ala Ser Leu Ser Ser Glu Ile Lys Tyr
        275                 280                 285

Thr Ala Pro His Asp Val Thr Ile Lys Asp Gln Gln Lys Ala Asn Gln
    290                 295                 300

Leu Ala Ser Glu Leu Asn Asn Gln Lys Ile Pro His Phe Tyr Asn Tyr
305                 310                 315                 320

Lys Glu Val Ile His Thr Lys Leu Tyr Lys Asp Asn Leu Phe Asp Val
                325                 330                 335

Lys Ala Lys Glu Pro Tyr Asn Val Thr Ile Thr Ser Asp Lys Tyr Ile
            340                 345                 350

Pro Asn Thr Asp Leu Lys Arg Gly Gln Ala Asp Leu Phe Val Ala Glu
        355                 360                 365

Gly Ser Ile Lys Asp Leu Val Lys His Lys Lys His Gly Lys Ala Ile
    370                 375                 380

Ile Gly Thr Lys Lys His His Val Asn Ile Lys Leu Arg Lys Asp Ile
385                 390                 395                 400

Asn Lys Ile Tyr Phe Met Thr Asp Val Asp Leu Gly Gly Pro Thr Phe
                405                 410                 415

Val Leu Asn Asp Lys Asp Tyr Gln Glu Ile Arg Lys Tyr Thr Lys Ala
            420                 425                 430

Lys His Ile Val Ser Gln Phe Gly Phe Asp Leu Lys His Lys Lys Asp
        435                 440                 445

Ala Leu Ala Leu Glu Lys Ala Lys Asn Lys Val Asp Lys Ser Ile Glu
    450                 455                 460

Thr Arg Ser Glu Ala Ile Ser Ser Ile Ser Ser Leu Thr Gly Ile Leu
465                 470                 475                 480

Leu Phe Val Thr Ser Phe Leu Gly Ile Thr Phe Leu Ile Ala Val Cys
                485                 490                 495
```

```
Cys Ile Ile Tyr Ile Lys Gln Ile Asp Glu Thr Glu Asp Glu Leu Glu
            500                 505                 510

Asn Tyr Ser Ile Leu Arg Lys Leu Gly Phe Thr Gln Lys Asp Met Ala
        515                 520                 525

Arg Gly Leu Lys Phe Lys Ile Met Phe Asn Phe Gly Leu Pro Leu Val
    530                 535                 540

Ile Ala Leu Ser His Ala Tyr Phe Thr Ser Leu Ala Tyr Met Lys Leu
545                 550                 555                 560

Met Gly Thr Thr Asn Gln Ile Pro Val Phe Ile Val Met Gly Leu Tyr
                565                 570                 575

Ile Cys Met Tyr Ala Val Phe Ala Val Thr Ala Tyr Asn His Ser Lys
            580                 585                 590

Arg Thr Ile Arg His Ser Ile
        595
```

<210> 111
<211> 584
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 111

```
Met Thr Glu Ser Tyr Pro Ile Ile Lys Glu Gly Ser Gln Val Gly Ser
1               5                   10                  15

Tyr Phe Leu Phe Phe Ile Ile Ile Ala Phe Leu Leu Tyr Ala Asn Val
            20                  25                  30

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

Gly Leu Ser Lys Phe Asn Ile Ile Tyr Ile Leu Met Leu Glu Gln Leu
    50                  55                  60

Leu Ile Phe Ile Ile Thr Ala Ile Leu Gly Ile Ile Ile Gly Ile Phe
```

```
65                  70                  75                  80

Gly Ser Lys Leu Leu Leu Met Ile Val Phe Thr Leu Leu Gly Ile Lys
                85                  90                  95

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

Met Leu Ile Gly Val Ala Tyr Phe Leu Thr Ser Ala Gln Asn Phe Ile
        115                 120                 125

Leu Val Phe Lys Gln Ser Ile Ser Gln Met Ser Lys Asn Asn Gln Val
    130                 135                 140

Lys Glu Thr Asn His Asn Lys Ile Thr Phe Glu Glu Val Val Leu Gly
145                 150                 155                 160

Ile Leu Gly Ile Val Leu Ile Thr Thr Gly Tyr Tyr Leu Ser Leu Asn
                165                 170                 175

Ile Val Gln Tyr Tyr Asp Ser Ile Gly Thr Leu Met Phe Ile Leu Leu
            180                 185                 190

Ser Thr Val Ile Gly Ala Tyr Leu Phe Phe Lys Ser Ser Val Ser Leu
        195                 200                 205

Val Phe Lys Met Val Lys Lys Phe Arg Lys Gly Val Ile Ser Val Asn
    210                 215                 220

Asp Val Met Phe Ser Ser Ser Ile Met Tyr Arg Ile Lys Lys Asn Ala
225                 230                 235                 240

Phe Ser Leu Thr Val Met Ala Ile Ile Ser Ala Ile Thr Val Ser Val
                245                 250                 255

Leu Cys Phe Ala Ala Ile Ser Arg Ala Ser Leu Ser Ser Glu Ile Lys
            260                 265                 270

Tyr Thr Ala Pro His Asp Val Thr Ile Lys Asp Gln Gln Lys Ala Asn
        275                 280                 285
```

```
Gln Leu Ala Ser Glu Leu Asn Asn Gln Lys Ile Pro His Phe Tyr Asn
    290                 295                 300

Tyr Lys Glu Val Ile His Thr Lys Leu Tyr Lys Asp Asn Leu Phe Asp
305                 310                 315                 320

Val Lys Ala Lys Glu Pro Tyr Asn Val Thr Ile Thr Ser Asp Lys Tyr
                325                 330                 335

Ile Pro Asn Thr Asp Leu Lys Arg Gly Gln Ala Asp Leu Phe Val Ala
            340                 345                 350

Glu Gly Ser Ile Lys Asp Leu Val Lys His Lys Lys His Gly Lys Ala
        355                 360                 365

Ile Ile Gly Thr Lys Lys His His Val Asn Ile Lys Leu Arg Lys Asp
    370                 375                 380

Ile Asn Lys Ile Tyr Phe Met Thr Asp Val Asp Leu Gly Gly Pro Thr
385                 390                 395                 400

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

Ala Lys His Ile Val Ser Gln Phe Gly Phe Asp Leu Lys His Lys Lys
            420                 425                 430

Asp Ala Leu Ala Leu Glu Lys Ala Lys Asn Lys Val Asp Lys Ser Ile
        435                 440                 445

Glu Thr Arg Ser Glu Ala Ile Ser Ser Ile Ser Ser Leu Thr Gly Ile
    450                 455                 460

Leu Leu Phe Val Thr Ser Phe Leu Gly Ile Thr Phe Leu Ile Ala Val
465                 470                 475                 480

Cys Cys Ile Ile Tyr Ile Lys Gln Ile Asp Glu Thr Glu Asp Glu Leu
                485                 490                 495

Glu Asn Tyr Ser Ile Leu Arg Lys Leu Gly Phe Thr Gln Lys Asp Met
```

```
            500                 505                 510

Ala Arg Gly Leu Lys Phe Lys Ile Met Phe Asn Phe Gly Leu Pro Leu
        515                 520                 525

Val Ile Ala Leu Ser His Ala Tyr Phe Thr Ser Leu Ala Tyr Met Lys
    530                 535                 540

Leu Met Gly Thr Thr Asn Gln Ile Pro Val Phe Ile Val Met Gly Leu
545                 550                 555                 560

Tyr Ile Cys Met Tyr Ala Val Phe Ala Val Thr Ala Tyr Asn His Ser
                565                 570                 575

Lys Arg Thr Ile Arg His Ser Ile
            580
```

<210> 112
<211> 584
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 112

```
Met Thr Glu Ser Tyr Pro Ile Ile Lys Glu Gly Ser Gln Val Gly Ser
1               5                   10                  15

Tyr Phe Leu Phe Phe Ile Ile Ile Ala Phe Leu Leu Tyr Ala Asn Val
            20                  25                  30

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

Gly Leu Ser Lys Phe Asn Ile Ile Tyr Ile Leu Met Leu Glu Gln Leu
    50                  55                  60

Leu Ile Phe Ile Ile Thr Ala Ile Leu Gly Ile Ile Ile Gly Ile Phe
65                  70                  75                  80

Gly Ser Lys Leu Leu Leu Met Ile Val Phe Thr Leu Leu Gly Ile Lys
                85                  90                  95
```

```
Glu Lys Val Pro Ile Ile Phe Ser Leu Arg Ala Val Phe Glu Thr Leu
            100                 105                 110

Met Leu Ile Gly Val Ala Tyr Phe Leu Thr Ser Ala Gln Asn Phe Ile
        115                 120                 125

Leu Val Phe Lys Gln Ser Ile Ser Gln Met Ser Lys Asn Asn Gln Val
    130                 135                 140

Lys Glu Thr Asn His Asn Lys Ile Thr Phe Glu Glu Val Val Leu Gly
145                 150                 155                 160

Ile Leu Gly Ile Val Leu Ile Ile Thr Gly Tyr Tyr Leu Ser Leu Asn
                165                 170                 175

Ile Val Gln Tyr Tyr Asp Ser Ile Gly Ile Leu Met Phe Ile Leu Leu
            180                 185                 190

Ser Thr Val Ile Gly Ala Tyr Leu Phe Phe Lys Ser Ser Val Ser Leu
        195                 200                 205

Val Phe Lys Met Val Lys Lys Phe Arg Lys Gly Val Ile Ser Val Asn
    210                 215                 220

Asp Val Met Phe Ser Ser Ser Ile Met Tyr Arg Ile Lys Lys Asn Ala
225                 230                 235                 240

Phe Ser Leu Thr Val Met Ala Ile Ile Ser Ala Ile Thr Val Ser Val
                245                 250                 255

Leu Cys Phe Ala Ala Ile Ser Arg Ala Ser Leu Ser Ser Glu Ile Lys
            260                 265                 270

Tyr Thr Ala Pro His Asp Val Thr Ile Lys Asp Gln Gln Lys Ala Asn
        275                 280                 285

Gln Leu Ala Ser Glu Leu Asn Asn Gln Lys Ile Pro His Phe Tyr Asn
    290                 295                 300

Tyr Lys Glu Val Ile His Thr Lys Leu Tyr Lys Asp Asn Leu Phe Asp
305                 310                 315                 320
```

```
Val Lys Ala Lys Glu Pro Tyr Asn Val Thr Ile Thr Ser Asp Lys Tyr
                325                 330                 335

Ile Pro Asn Thr Asp Leu Lys Arg Gly Gln Ala Asp Leu Phe Val Ala
            340                 345                 350

Glu Gly Ser Ile Lys Asp Leu Val Lys His Lys Lys His Gly Lys Ala
        355                 360                 365

Ile Ile Gly Thr Lys Lys His His Val Asn Ile Lys Leu Arg Lys Asp
    370                 375                 380

Ile Asn Lys Ile Tyr Phe Met Thr Asp Val Asp Leu Gly Gly Pro Thr
385                 390                 395                 400

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

Ala Lys His Ile Val Ser Gln Phe Gly Phe Asp Leu Lys His Lys Lys
            420                 425                 430

Asp Ala Leu Ala Leu Glu Lys Val Lys Asn Lys Val Asp Lys Ser Ile
        435                 440                 445

Lys Thr Arg Ser Glu Ala Ile Ser Ser Ile Ser Ser Leu Thr Gly Ile
    450                 455                 460

Leu Leu Phe Val Thr Ser Phe Leu Gly Ile Thr Phe Leu Ile Ala Val
465                 470                 475                 480

Cys Cys Ile Ile Tyr Ile Lys Gln Ile Asp Glu Thr Glu Asp Glu Leu
                485                 490                 495

Glu Asn Tyr Ser Ile Leu Arg Lys Leu Gly Phe Thr Gln Lys Asp Met
            500                 505                 510

Ala Arg Gly Leu Lys Phe Lys Ile Met Phe Asn Phe Gly Leu Pro Leu
        515                 520                 525
```

```
Val Ile Ala Leu Ser His Ala Tyr Phe Thr Ser Leu Ala Tyr Met Lys
    530                 535                 540

Leu Met Gly Thr Thr Asn Gln Ile Pro Val Phe Ile Val Met Gly Leu
545                 550                 555                 560

Tyr Ile Cys Met Tyr Ala Val Phe Ala Val Thr Ala Tyr Asn His Ser
                565                 570                 575

Lys Arg Thr Ile Arg His Ser Ile
            580
```

<210> 113
<211> 584
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 113

```
Met Thr Glu Ser Tyr Pro Ile Ile Lys Glu Gly Ser Gln Val Gly Ser
1               5                   10                  15

Tyr Phe Leu Phe Phe Ile Ile Ile Ala Phe Leu Leu Tyr Ala Asn Val
            20                  25                  30

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

Gly Leu Ser Lys Phe Asn Ile Ile Tyr Ile Leu Met Leu Glu Gln Leu
    50                  55                  60

Leu Ile Phe Ile Ile Thr Ala Ile Leu Gly Ile Ile Ile Gly Ile Phe
65                  70                  75                  80

Gly Ser Lys Leu Leu Leu Met Ile Val Phe Thr Leu Leu Gly Ile Lys
                85                  90                  95

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

Met Leu Ile Gly Val Ala Tyr Phe Leu Thr Ser Ala Gln Asn Phe Ile
        115                 120                 125
```

```
Leu Val Phe Lys Gln Ser Ile Ser Gln Met Ser Lys Asn Asn Gln Val
    130                 135                 140

Lys Glu Thr Asn His Asn Lys Ile Thr Phe Glu Glu Val Val Leu Gly
145                 150                 155                 160

Ile Leu Gly Ile Val Leu Ile Ile Thr Gly Tyr Tyr Leu Ser Leu Asn
                165                 170                 175

Ile Val Gln Tyr Tyr Asp Ser Ile Gly Ile Leu Met Phe Ile Leu Leu
            180                 185                 190

Ser Thr Val Ile Gly Ala Tyr Leu Phe Phe Lys Ser Ser Val Ser Leu
        195                 200                 205

Val Phe Lys Met Val Lys Lys Phe Arg Lys Gly Val Ile Ser Val Asn
    210                 215                 220

Asp Val Met Phe Ser Ser Ser Ile Met Tyr Arg Ile Lys Lys Asn Ala
225                 230                 235                 240

Phe Ser Leu Thr Val Met Ala Ile Ile Ser Ala Ile Thr Val Ser Val
                245                 250                 255

Leu Cys Phe Ala Ala Ile Ser Arg Ala Ser Leu Ser Ser Glu Ile Lys
            260                 265                 270

Tyr Thr Ala Pro His Asp Val Thr Ile Lys Asp Gln Gln Lys Ala Asn
        275                 280                 285

Gln Leu Ala Ser Glu Leu Asn Asn Gln Lys Ile Pro His Phe Tyr Asn
    290                 295                 300

Tyr Lys Glu Val Ile His Thr Lys Leu Tyr Lys Asp Asn Leu Phe Asp
305                 310                 315                 320

Val Lys Ala Lys Glu Pro Tyr Asn Val Thr Ile Thr Ser Asp Lys Tyr
                325                 330                 335

Ile Pro Asn Thr Asp Leu Lys Arg Gly Gln Ala Asp Leu Phe Val Ala
```

```
            340                 345                 350

Glu Gly Ser Ile Lys Asp Leu Val Lys His Lys Lys His Gly Lys Ala
        355                 360                 365

Ile Ile Gly Thr Lys Lys His His Val Asn Ile Lys Leu Arg Lys Asp
    370                 375                 380

Ile Asn Lys Ile Tyr Phe Met Thr Asp Val Asp Leu Gly Gly Pro Thr
385                 390                 395                 400

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

Ala Lys His Ile Val Ser Gln Phe Gly Phe Asp Leu Lys His Lys Lys
            420                 425                 430

Asp Ala Leu Ala Leu Glu Lys Val Lys Asn Lys Val Asp Lys Ser Ile
        435                 440                 445

Lys Thr Arg Ser Glu Ala Ile Ser Ser Ile Ser Ser Leu Thr Gly Ile
    450                 455                 460

Leu Leu Phe Val Thr Ser Phe Leu Gly Ile Thr Phe Leu Ile Ala Val
465                 470                 475                 480

Cys Cys Ile Ile Tyr Ile Lys Gln Ile Asp Glu Thr Glu Asp Glu Leu
                485                 490                 495

Glu Asn Tyr Ser Ile Leu Arg Lys Leu Gly Phe Thr Gln Lys Asp Met
            500                 505                 510

Ala Arg Gly Leu Lys Phe Lys Ile Met Phe Asn Phe Gly Leu Pro Leu
        515                 520                 525

Val Ile Val Leu Ser His Ala Tyr Phe Thr Ser Leu Ala Tyr Met Lys
    530                 535                 540

Leu Met Gly Thr Thr Asn Gln Ile Pro Val Phe Ile Val Met Gly Leu
545                 550                 555                 560
```

```
Tyr Ile Cys Met Tyr Ala Val Phe Ala Val Thr Ala Tyr Asn His Ser
                565                 570                 575

Lys Arg Thr Ile Arg His Ser Ile
            580
```

<210> 114
<211> 584
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 114

```
Met Thr Glu Ser Tyr Pro Ile Ile Lys Glu Gly Ser Gln Val Gly Ser
1               5                   10                  15

Tyr Phe Leu Phe Phe Ile Ile Ile Ala Phe Leu Leu Tyr Ala Asn Val
            20                  25                  30

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

Gly Leu Ser Lys Phe Asn Ile Ile Tyr Ile Leu Met Leu Glu Gln Leu
    50                  55                  60

Leu Ile Phe Ile Ile Thr Ala Ile Leu Gly Ile Ile Ile Gly Ile Phe
65                  70                  75                  80

Gly Ser Lys Leu Leu Leu Met Ile Val Phe Thr Leu Leu Gly Ile Lys
                85                  90                  95

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

Met Leu Ile Gly Val Ala Tyr Phe Leu Thr Ser Ala Gln Asn Phe Ile
        115                 120                 125

Leu Val Phe Lys Gln Ser Ile Ser Gln Met Ser Lys Asn Asn Gln Val
    130                 135                 140

Lys Glu Thr Asn His Asn Lys Ile Thr Phe Glu Glu Val Val Leu Gly
145                 150                 155                 160
```

```
Ile Leu Gly Ile Val Leu Ile Thr Thr Gly Tyr Tyr Leu Ser Leu Asn
                165                 170                 175

Ile Val Gln Tyr Tyr Asp Ser Ile Gly Ile Leu Met Phe Ile Leu Leu
            180                 185                 190

Ser Thr Val Ile Gly Ala Tyr Leu Phe Phe Lys Ser Ser Val Ser Leu
        195                 200                 205

Val Phe Lys Met Val Lys Lys Phe Arg Lys Gly Val Ile Ser Val Asn
    210                 215                 220

Asp Val Met Phe Ser Ser Ser Ile Met Tyr Arg Ile Lys Lys Asn Ala
225                 230                 235                 240

Phe Ser Leu Thr Val Met Ala Ile Ile Ser Ala Ile Thr Val Ser Val
                245                 250                 255

Leu Cys Phe Ala Ala Ile Ser Arg Ala Ser Leu Ser Ser Glu Ile Lys
            260                 265                 270

Tyr Thr Ala Pro His Asp Val Thr Ile Lys Asp Gln Gln Lys Ala Asn
        275                 280                 285

Gln Leu Ala Ser Glu Leu Asn Asn Gln Lys Ile Pro His Phe Tyr Asn
    290                 295                 300

Tyr Lys Glu Val Ile His Thr Lys Leu Tyr Lys Asp Asn Leu Phe Asp
305                 310                 315                 320

Val Lys Ala Lys Glu Pro Tyr Asn Val Thr Ile Thr Ser Asp Lys Tyr
                325                 330                 335

Ile Pro Asn Thr Asp Leu Lys Arg Gly Gln Ala Asp Leu Phe Val Ala
            340                 345                 350

Glu Gly Ser Ile Lys Asp Leu Val Lys His Lys Lys His Gly Lys Ala
        355                 360                 365
```

```
Ile Ile Gly Thr Lys Lys His His Val Asn Ile Lys Leu Arg Lys Asp
    370                 375                 380

Ile Asn Lys Ile Tyr Phe Met Thr Asp Val Asp Leu Gly Gly Pro Thr
385                 390                 395                 400

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

Ala Lys His Ile Val Ser Gln Phe Gly Phe Asp Leu Lys His Lys Lys
            420                 425                 430

Asp Ala Leu Ala Leu Glu Lys Val Lys Asn Lys Val Asp Lys Ser Ile
        435                 440                 445

Lys Thr Arg Ser Glu Ala Ile Ser Ser Ile Ser Ser Leu Thr Gly Ile
    450                 455                 460

Leu Leu Phe Val Thr Ser Phe Leu Gly Ile Thr Phe Leu Ile Ala Val
465                 470                 475                 480

Cys Cys Ile Ile Tyr Ile Lys Gln Ile Asp Glu Thr Glu Asp Glu Leu
                485                 490                 495

Glu Asn Tyr Ser Ile Leu Arg Lys Leu Gly Phe Thr Gln Lys Asp Met
            500                 505                 510

Ala Arg Gly Leu Lys Phe Lys Ile Met Phe Asn Phe Gly Leu Pro Leu
        515                 520                 525

Val Ile Ala Leu Ser His Ala Tyr Phe Thr Ser Leu Ala Tyr Met Lys
    530                 535                 540

Leu Met Gly Thr Thr Asn Gln Ile Pro Val Phe Ile Val Met Gly Leu
545                 550                 555                 560

Tyr Ile Cys Met Tyr Ala Val Phe Ala Val Thr Ala Tyr Asn His Ser
                565                 570                 575

Lys Arg Thr Ile Arg His Ser Ile
            580
```

<210> 115
<211> 629
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 115

```
Met Thr Phe Asn Glu Ile Ile Phe Lys Asn Phe Arg Gln Asn Leu Ser
1               5                  10                  15


His Tyr Ala Ile Tyr Leu Phe Ser Leu Ile Thr Ser Val Val Leu Tyr
            20                  25                  30


Phe Ser Phe Val Ala Leu Lys Tyr Ala His Lys Leu Asn Met Thr Glu
        35                  40                  45


Ser Tyr Pro Ile Ile Lys Glu Gly Ser Gln Val Gly Ser Tyr Phe Leu
    50                  55                  60


Phe Phe Ile Ile Ile Ala Phe Leu Leu Tyr Ala Asn Val Leu Phe Ile
65                  70                  75                  80


Lys Arg Arg Ser Tyr Glu Leu Ala Leu Tyr Gln Thr Leu Gly Leu Ser
                85                  90                  95


Lys Phe Asn Ile Ile Tyr Ile Leu Met Leu Glu Gln Leu Leu Ile Phe
            100                 105                 110


Ile Ile Thr Ala Ile Leu Gly Ile Ile Ile Gly Ile Phe Gly Ser Lys
        115                 120                 125


Leu Leu Leu Met Ile Val Phe Thr Leu Leu Gly Ile Lys Glu Lys Val
    130                 135                 140


Pro Ile Ile Phe Ser Leu Arg Ala Val Phe Glu Thr Leu Met Leu Ile
145                 150                 155                 160


Gly Val Ala Tyr Phe Leu Thr Ser Ala Gln Asn Phe Ile Leu Val Phe
                165                 170                 175


Lys Gln Ser Ile Ser Gln Met Ser Lys Asn Asn Gln Val Lys Glu Thr
```

```
            180                 185                 190

Asn His Asn Lys Ile Thr Phe Glu Glu Val Val Leu Gly Ile Leu Gly
        195                 200                 205

Ile Val Leu Ile Thr Thr Gly Tyr Tyr Leu Ser Leu Asn Ile Val Gln
    210                 215                 220

Tyr Tyr Asp Ser Ile Gly Ile Leu Met Phe Ile Leu Leu Ser Thr Val
225                 230                 235                 240

Ile Gly Ala Tyr Leu Phe Phe Lys Ser Ser Val Ser Leu Val Phe Lys
                245                 250                 255

Met Val Lys Lys Phe Arg Lys Gly Val Ile Ser Val Asn Asp Val Met
            260                 265                 270

Phe Ser Ser Ser Ile Met Tyr Arg Ile Lys Lys Asn Ala Phe Ser Leu
        275                 280                 285

Thr Val Met Ala Ile Ile Ser Ala Ile Thr Val Ser Val Leu Cys Phe
    290                 295                 300

Ala Ala Ile Ser Arg Ala Ser Leu Ser Ser Glu Ile Lys Tyr Thr Ala
305                 310                 315                 320

Pro His Asp Val Thr Ile Lys Asp Gln Gln Lys Ala Asn Gln Leu Ala
                325                 330                 335

Ser Glu Leu Asn Asn Gln Lys Ile Pro His Phe Tyr Asn Tyr Lys Glu
            340                 345                 350

Val Ile His Thr Lys Leu Tyr Lys Asp Asn Leu Phe Asp Val Lys Ala
        355                 360                 365

Lys Glu Pro Tyr Asn Val Thr Ile Thr Ser Asp Lys Tyr Ile Pro Asn
    370                 375                 380

Thr Asp Leu Lys Arg Gly Gln Ala Asp Leu Phe Val Ala Glu Gly Ser
385                 390                 395                 400
```

```
Ile Lys Asp Leu Val Lys His Lys Lys His Gly Lys Ala Ile Ile Gly
                405                 410                 415

Thr Lys Lys His His Val Asn Ile Lys Leu Arg Lys Asp Ile Asn Lys
            420                 425                 430

Ile Tyr Phe Met Thr Asp Val Asp Leu Gly Gly Pro Thr Phe Val Leu
        435                 440                 445

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

Ile Val Ser Gln Phe Gly Phe Asp Leu Lys His Lys Lys Asp Ala Leu
465                 470                 475                 480

Ala Leu Glu Lys Val Lys Asn Lys Val Asp Lys Ser Ile Lys Thr Arg
                485                 490                 495

Ser Glu Ala Ile Ser Ser Ile Ser Ser Leu Thr Gly Ile Leu Leu Phe
            500                 505                 510

Val Thr Ser Phe Leu Gly Ile Thr Phe Leu Ile Ala Val Cys Cys Ile
        515                 520                 525

Ile Tyr Ile Lys Gln Ile Asp Glu Thr Glu Asp Glu Leu Glu Asn Tyr
    530                 535                 540

Ser Ile Leu Arg Lys Leu Gly Phe Thr Gln Lys Asp Met Ala Arg Gly
545                 550                 555                 560

Leu Lys Phe Lys Ile Met Phe Asn Phe Gly Leu Pro Leu Val Ile Ala
                565                 570                 575

Leu Ser His Ala Tyr Phe Thr Ser Leu Ala Tyr Met Lys Leu Met Gly
            580                 585                 590

Thr Thr Asn Gln Ile Pro Val Phe Ile Val Met Gly Leu Tyr Ile Cys
        595                 600                 605

Met Tyr Ala Val Phe Ala Val Thr Ala Tyr Asn His Ser Lys Arg Thr
```

610 615 620

Ile Arg His Ser Ile
625

<210> 116
<211> 629
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 116

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

His Tyr Ala Ile Tyr Leu Phe Ser Leu Ile Thr Ser Val Val Leu Tyr
20 25 30

Phe Ser Phe Val Ala Leu Lys Tyr Ala His Lys Leu Asn Met Thr Glu
35 40 45

Ser Tyr Pro Ile Ile Lys Glu Gly Ser Gln Val Gly Ser Tyr Phe Leu
50 55 60

Phe Phe Ile Ile Ile Ala Phe Leu Leu Tyr Ala Asn Val Leu Phe Ile
65 70 75 80

Lys Arg Arg Ser Tyr Glu Leu Ala Leu Tyr Gln Thr Leu Gly Leu Ser
85 90 95

Lys Phe Asn Ile Ile Tyr Ile Leu Met Leu Glu Gln Leu Leu Ile Phe
100 105 110

Ile Ile Thr Ala Ile Leu Gly Ile Ile Ile Gly Ile Phe Gly Ser Lys
115 120 125

Leu Leu Leu Met Ile Val Phe Thr Leu Leu Gly Ile Lys Glu Lys Val
130 135 140

Pro Ile Ile Phe Ser Leu Arg Ala Val Phe Glu Thr Leu Met Leu Ile
145 150 155 160

```
Gly Val Ala Tyr Phe Leu Thr Ser Ala Gln Asn Phe Ile Leu Val Phe
                165                 170                 175

Lys Gln Ser Ile Ser Gln Met Ser Lys Asn Asn Gln Val Lys Glu Thr
            180                 185                 190

Asn His Asn Lys Ile Thr Phe Glu Glu Val Val Leu Gly Ile Leu Gly
        195                 200                 205

Ile Val Leu Ile Thr Thr Gly Tyr Tyr Leu Ser Leu Asn Ile Val Gln
    210                 215                 220

Tyr Tyr Asp Ser Ile Gly Ile Leu Met Phe Ile Leu Leu Ser Thr Val
225                 230                 235                 240

Ile Gly Ala Tyr Leu Phe Phe Lys Ser Ser Val Ser Leu Val Phe Lys
                245                 250                 255

Met Val Lys Lys Phe Arg Lys Gly Val Ile Ser Val Asn Asp Val Met
            260                 265                 270

Phe Ser Ser Ser Ile Met Tyr Arg Ile Lys Lys Asn Ala Phe Ser Leu
        275                 280                 285

Thr Val Met Ala Ile Ile Ser Ala Ile Thr Val Ser Val Leu Cys Phe
    290                 295                 300

Ala Ala Ile Ser Arg Ala Ser Leu Ser Ser Glu Ile Lys Tyr Thr Ala
305                 310                 315                 320

Pro His Asp Val Thr Ile Lys Asp Gln Gln Lys Ala Asn Gln Leu Ala
                325                 330                 335

Ser Glu Leu Asn Asn Gln Lys Ile Pro His Phe Tyr Asn Tyr Lys Glu
            340                 345                 350

Val Ile His Thr Lys Leu Tyr Lys Asp Asn Leu Phe Asp Val Lys Ala
        355                 360                 365

Lys Glu Pro Tyr Asn Val Thr Ile Thr Ser Asp Lys Tyr Ile Pro Asn
    370                 375                 380
```

```
Thr Asp Leu Lys Arg Gly Gln Ala Asp Leu Phe Val Ala Glu Gly Ser
385                 390                 395                 400

Ile Lys Asp Leu Val Lys His Lys Lys His Gly Lys Ala Ile Ile Gly
                405                 410                 415

Thr Lys Lys His His Val Asn Ile Lys Leu Arg Lys Asp Ile Asn Lys
            420                 425                 430

Ile Tyr Phe Met Thr Asp Val Asp Leu Gly Gly Pro Thr Phe Val Leu
        435                 440                 445

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

Ile Val Ser Gln Phe Gly Phe Asp Leu Lys His Lys Lys Asp Ala Leu
465                 470                 475                 480

Ala Leu Glu Lys Val Lys Asn Lys Val Asp Lys Ser Ile Lys Thr Arg
                485                 490                 495

Ser Glu Ala Ile Ser Ser Ile Ser Ser Leu Thr Gly Ile Leu Leu Phe
            500                 505                 510

Val Thr Ser Phe Leu Gly Ile Thr Phe Leu Ile Ala Val Cys Cys Ile
        515                 520                 525

Ile Tyr Ile Lys Gln Ile Asp Glu Thr Glu Asp Glu Leu Glu Asn Tyr
    530                 535                 540

Ser Ile Leu Arg Lys Leu Gly Phe Thr Gln Lys Asp Met Ala Arg Gly
545                 550                 555                 560

Leu Lys Phe Lys Ile Met Phe Asn Phe Gly Leu Pro Leu Val Ile Ala
                565                 570                 575

Leu Ser His Ala Tyr Phe Thr Ser Leu Ala Tyr Met Lys Leu Met Gly
            580                 585                 590
```

```
Thr Thr Asn Gln Ile Pro Val Phe Ile Val Met Gly Leu Tyr Ile Cys
        595                 600                 605

Met Tyr Ala Val Phe Ala Val Thr Ala Tyr Asn His Ser Lys Arg Thr
    610                 615                 620

Ile Arg His Ser Ile
625
```

<210> 117
<211> 629
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 117

```
Met Thr Phe Asn Glu Ile Ile Phe Lys Asn Phe Arg Gln Asn Leu Ser
1               5                   10                  15

His Tyr Ala Ile Tyr Leu Phe Ser Leu Ile Thr Ser Val Val Leu Tyr
            20                  25                  30

Phe Ser Phe Val Ala Leu Lys Tyr Ala His Lys Leu Asn Met Thr Glu
        35                  40                  45

Ser Tyr Pro Ile Ile Lys Glu Gly Ser Gln Val Gly Ser Tyr Phe Leu
    50                  55                  60

Phe Phe Ile Ile Ile Ala Phe Leu Leu Tyr Ala Asn Val Leu Phe Ile
65                  70                  75                  80

Lys Arg Arg Ser Tyr Glu Leu Ala Leu Tyr Gln Thr Leu Gly Leu Ser
                85                  90                  95

Lys Phe Asn Ile Ile Tyr Ile Leu Met Leu Glu Gln Leu Leu Ile Phe
            100                 105                 110

Ile Ile Thr Ala Ile Leu Gly Ile Ile Ile Gly Ile Phe Gly Ser Lys
        115                 120                 125

Leu Leu Leu Met Ile Val Phe Thr Leu Leu Gly Ile Lys Glu Lys Val
    130                 135                 140
```

```
Pro Ile Ile Phe Ser Leu Arg Ala Val Phe Glu Thr Leu Met Leu Ile
145                 150                 155                 160

Gly Val Ala Tyr Phe Leu Thr Ser Ala Gln Asn Phe Ile Leu Val Phe
                165                 170                 175

Lys Gln Ser Ile Ser Gln Met Ser Lys Asn Asn Gln Val Lys Glu Thr
            180                 185                 190

Asn His Asn Lys Ile Thr Phe Glu Glu Val Val Leu Gly Ile Leu Gly
        195                 200                 205

Ile Val Leu Ile Thr Thr Gly Tyr Tyr Leu Ser Leu Asn Ile Val Gln
    210                 215                 220

Tyr Tyr Asp Ser Ile Gly Ile Leu Met Phe Ile Leu Leu Ser Thr Val
225                 230                 235                 240

Ile Gly Ala Tyr Leu Phe Phe Lys Ser Ser Val Ser Leu Val Phe Lys
                245                 250                 255

Met Val Lys Lys Phe Arg Lys Gly Val Ile Ser Val Asn Asp Val Met
            260                 265                 270

Phe Ser Ser Ser Ile Met Tyr Arg Ile Lys Lys Asn Ala Phe Ser Leu
        275                 280                 285

Thr Val Met Ala Ile Ile Ser Ala Ile Thr Val Ser Val Leu Cys Phe
    290                 295                 300

Ala Ala Ile Ser Arg Ala Ser Leu Ser Ser Glu Ile Lys Tyr Thr Ala
305                 310                 315                 320

Pro His Asp Val Thr Ile Lys Asp Gln Gln Lys Ala Asn Gln Leu Ala
                325                 330                 335

Ser Glu Leu Asn Asn Gln Lys Ile Pro His Phe Tyr Asn Tyr Lys Glu
            340                 345                 350

Val Ile His Thr Lys Leu Tyr Lys Asp Asn Leu Phe Asp Val Lys Ala
```

```
        355                 360                 365

Lys Glu Pro Tyr Asn Val Thr Ile Thr Ser Asp Lys Tyr Ile Pro Asn
    370                 375                 380

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

Ile Lys Asp Leu Val Lys His Lys Lys His Gly Lys Ala Val Ile Gly
                405                 410                 415

Thr Lys Lys His His Val Asn Ile Lys Leu Arg Lys Asp Ile Asn Lys
            420                 425                 430

Ile Tyr Phe Met Thr Asp Val Asp Leu Gly Gly Pro Thr Phe Val Leu
        435                 440                 445

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

Ile Val Ser Gln Phe Gly Phe Asp Leu Lys His Lys Lys Asp Ala Leu
465                 470                 475                 480

Ala Leu Glu Lys Val Lys Asn Lys Val Asp Lys Ser Ile Lys Thr Arg
                485                 490                 495

Ser Glu Ala Ile Ser Ser Ile Ser Ser Leu Thr Gly Ile Leu Leu Phe
            500                 505                 510

Val Thr Ser Phe Leu Gly Ile Thr Phe Leu Ile Ala Val Cys Cys Ile
        515                 520                 525

Ile Tyr Ile Lys Gln Ile Asp Glu Thr Glu Asp Glu Leu Glu Asn Tyr
    530                 535                 540

Ser Ile Leu Arg Lys Leu Gly Phe Thr Gln Lys Asp Met Ala Arg Gly
545                 550                 555                 560

Leu Lys Phe Lys Ile Met Phe Asn Phe Gly Leu Pro Leu Val Ile Ala
                565                 570                 575
```

```
Leu Ser His Ala Tyr Phe Thr Ser Leu Ala Tyr Met Lys Leu Met Gly
            580                 585                 590

Thr Thr Asn Gln Ile Pro Val Phe Ile Val Met Gly Leu Tyr Ile Cys
        595                 600                 605

Met Tyr Ala Val Phe Ala Val Thr Ala Tyr Asn His Ser Lys Arg Thr
    610                 615                 620

Ile Arg His Ser Ile
625
```

<210> 118
<211> 629
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 118

```
Met Thr Phe Asn Glu Ile Ile Phe Lys Asn Phe Arg Gln Asn Leu Ser
1               5                   10                  15

His Tyr Ala Ile Tyr Leu Phe Ser Leu Ile Thr Ser Val Val Leu Tyr
            20                  25                  30

Phe Ser Phe Val Ala Leu Lys Tyr Ala His Lys Leu Asn Met Thr Glu
        35                  40                  45

Ser Tyr Pro Ile Ile Lys Glu Gly Ser Gln Val Gly Ser Tyr Phe Leu
    50                  55                  60

Phe Phe Ile Ile Ile Ala Phe Leu Leu Tyr Ala Asn Val Leu Phe Ile
65                  70                  75                  80

Lys Arg Arg Ser Tyr Glu Leu Ala Leu Tyr Gln Thr Leu Gly Leu Ser
                85                  90                  95

Lys Phe Asn Ile Ile Tyr Ile Leu Met Leu Glu Gln Leu Leu Ile Phe
            100                 105                 110

Ile Ile Thr Ala Ile Leu Gly Ile Ile Ile Gly Ile Phe Gly Ser Lys
        115                 120                 125
```

```
Leu Leu Leu Met Ile Val Phe Thr Leu Leu Gly Ile Lys Glu Lys Val
    130                 135                 140

Pro Ile Ile Phe Ser Leu Arg Ala Val Phe Glu Thr Leu Met Leu Ile
145                 150                 155                 160

Gly Val Ala Tyr Phe Leu Thr Ser Ala Gln Asn Phe Ile Leu Val Phe
                165                 170                 175

Lys Gln Ser Ile Ser Gln Met Ser Lys Asn Asn Gln Val Lys Glu Thr
            180                 185                 190

Asn His Asn Lys Ile Thr Phe Glu Glu Val Val Leu Gly Ile Leu Gly
        195                 200                 205

Ile Val Leu Ile Thr Thr Gly Tyr Tyr Leu Ser Leu Asn Ile Val Gln
    210                 215                 220

Tyr Tyr Asp Ser Ile Gly Ile Leu Met Phe Ile Leu Leu Ser Thr Val
225                 230                 235                 240

Ile Gly Ala Tyr Leu Phe Phe Lys Ser Ser Val Ser Leu Val Phe Lys
                245                 250                 255

Met Val Lys Lys Phe Arg Lys Gly Val Ile Ser Val Asn Asp Val Met
            260                 265                 270

Phe Ser Ser Ser Ile Met Tyr Arg Ile Lys Lys Asn Ala Phe Ser Leu
        275                 280                 285

Thr Val Met Ala Ile Ile Ser Ala Ile Thr Val Ser Val Leu Cys Phe
    290                 295                 300

Ala Ala Ile Ser Arg Ala Ser Leu Ser Ser Glu Ile Lys Tyr Thr Ala
305                 310                 315                 320

Pro His Asp Val Thr Ile Lys Asp Gln Gln Lys Ala Asn Gln Leu Ala
                325                 330                 335
```

```
Ser Glu Leu Asn Asn Gln Lys Ile Pro His Phe Tyr Asn Tyr Lys Glu
            340                 345                 350

Val Ile His Thr Lys Leu Tyr Lys Asp Asn Leu Phe Asp Val Lys Ala
        355                 360                 365

Lys Glu Pro Tyr Asn Val Thr Ile Thr Ser Asp Lys Tyr Ile Pro Asn
    370                 375                 380

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

Ile Lys Asp Leu Val Lys His Lys Lys His Gly Lys Ala Val Ile Gly
                405                 410                 415

Thr Lys Lys His His Val Asn Ile Lys Leu Arg Lys Asp Ile Asn Lys
            420                 425                 430

Ile Tyr Phe Met Thr Asp Val Asp Leu Gly Gly Pro Thr Phe Val Leu
        435                 440                 445

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

Ile Val Ser Gln Phe Gly Phe Asp Leu Lys His Lys Lys Asp Ala Leu
465                 470                 475                 480

Ala Leu Glu Lys Val Lys Asn Lys Val Asp Lys Ser Ile Lys Thr Arg
                485                 490                 495

Ser Glu Ala Ile Ser Ser Ile Ser Ser Leu Thr Gly Ile Leu Leu Phe
            500                 505                 510

Val Thr Ser Phe Leu Gly Ile Thr Phe Leu Ile Ala Val Cys Cys Ile
        515                 520                 525

Ile Tyr Ile Lys Gln Ile Asp Glu Thr Glu Asp Glu Leu Glu Asn Tyr
    530                 535                 540

Ser Ile Leu Arg Lys Leu Gly Phe Thr Gln Lys Asp Met Ala Arg Gly
545                 550                 555                 560
```

```
Leu Lys Phe Lys Ile Met Phe Asn Phe Gly Leu Pro Leu Val Ile Ala
                565                 570                 575

Leu Ser His Ala Tyr Phe Thr Ser Leu Ala Tyr Met Lys Leu Met Gly
            580                 585                 590

Thr Thr Asn Gln Ile Pro Val Phe Ile Val Met Gly Leu Tyr Ile Cys
        595                 600                 605

Met Tyr Ala Val Phe Ala Val Thr Ala Tyr Asn His Ser Lys Arg Thr
    610                 615                 620

Ile Arg His Ser Ile
625
```

<210> 119
<211> 629
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 119

```
Met Thr Phe Asn Glu Ile Ile Phe Lys Asn Phe Arg Gln Asn Leu Ser
1               5                   10                  15

His Tyr Ala Ile Tyr Leu Phe Ser Leu Ile Thr Ser Val Val Leu Tyr
            20                  25                  30

Phe Ser Phe Val Ala Leu Lys Tyr Ala His Lys Leu Asn Met Thr Glu
        35                  40                  45

Ser Tyr Pro Ile Ile Lys Glu Gly Ser Gln Val Gly Ser Tyr Phe Leu
    50                  55                  60

Phe Phe Ile Ile Ile Ala Phe Leu Leu Tyr Ala Asn Val Leu Phe Ile
65                  70                  75                  80

Lys Arg Arg Ser Tyr Glu Leu Ala Leu Tyr Gln Thr Leu Gly Leu Ser
                85                  90                  95

Lys Phe Asn Ile Ile Tyr Ile Leu Met Leu Glu Gln Leu Leu Ile Phe
```

```
            100                 105                 110

Ile Ile Thr Ala Ile Leu Gly Ile Ile Ile Gly Ile Phe Gly Ser Lys
        115                 120                 125

Leu Leu Leu Met Ile Val Phe Thr Leu Leu Gly Ile Lys Glu Lys Val
    130                 135                 140

Pro Ile Ile Phe Ser Leu Arg Ala Val Phe Glu Thr Leu Met Leu Ile
145                 150                 155                 160

Gly Val Ala Tyr Phe Leu Thr Ser Ala Gln Asn Phe Ile Leu Val Phe
                165                 170                 175

Lys Gln Ser Ile Ser Gln Met Ser Lys Asn Asn Gln Val Lys Glu Thr
            180                 185                 190

Asn His Asn Lys Ile Thr Phe Glu Glu Val Val Leu Gly Ile Leu Gly
        195                 200                 205

Ile Val Leu Ile Thr Thr Gly Tyr Tyr Leu Ser Leu Asn Ile Val Gln
    210                 215                 220

Tyr Tyr Asp Ser Ile Gly Thr Leu Met Phe Ile Leu Leu Ser Thr Val
225                 230                 235                 240

Ile Gly Ala Tyr Leu Phe Phe Lys Ser Ser Val Ser Leu Val Phe Lys
                245                 250                 255

Met Val Lys Lys Phe Arg Lys Gly Val Ile Ser Val Asn Asp Val Met
            260                 265                 270

Phe Ser Ser Ser Ile Met Tyr Arg Ile Lys Lys Asn Ala Phe Ser Leu
        275                 280                 285

Thr Val Met Ala Ile Ile Ser Ala Ile Thr Val Ser Val Leu Cys Phe
    290                 295                 300

Ala Ala Ile Ser Arg Ala Ser Leu Ser Ser Glu Ile Lys Tyr Thr Ala
305                 310                 315                 320
```

```
Pro His Asp Val Thr Ile Lys Asp Gln Gln Lys Ala Asn Gln Leu Ala
               325                 330                 335

Ser Glu Leu Asn Asn Gln Lys Ile Pro His Phe Tyr Asn Tyr Lys Glu
            340                 345                 350

Val Ile His Thr Lys Leu Tyr Lys Asp Asn Leu Phe Asp Val Lys Ser
        355                 360                 365

Lys Gln Pro Tyr Asn Val Thr Ile Thr Ser Asp Lys Tyr Ile Pro Ser
    370                 375                 380

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

Ile Lys Asp Leu Val Lys His Lys Lys His Gly Lys Ala Val Ile Gly
               405                 410                 415

Thr Lys Lys His His Val Asn Ile Lys Leu Arg Lys Asp Ile Asn Lys
            420                 425                 430

Ile Tyr Phe Met Thr Asp Val Asp Leu Gly Gly Pro Thr Phe Val Leu
        435                 440                 445

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

Ile Val Ser Gln Phe Gly Phe Asp Leu Lys His Lys Lys Asp Ala Leu
465                 470                 475                 480

Ala Leu Glu Lys Ala Lys Asn Lys Val Asp Lys Ser Ile Glu Thr Arg
               485                 490                 495

Ser Glu Ala Ile Ser Ser Ile Ser Ser Leu Thr Gly Ile Leu Leu Phe
            500                 505                 510

Val Thr Ser Phe Leu Gly Ile Thr Phe Leu Ile Ala Val Cys Cys Ile
        515                 520                 525

Ile Tyr Ile Lys Gln Ile Asp Glu Thr Glu Asp Glu Leu Glu Asn Tyr
```

530 535 540

Ser Ile Leu Arg Lys Leu Gly Phe Thr Gln Lys Asp Met Ala Arg Gly
545 550 555 560

Leu Lys Phe Lys Ile Met Phe Asn Phe Gly Leu Pro Leu Val Ile Ala
565 570 575

Leu Ser His Ala Tyr Phe Thr Ser Leu Ala Tyr Met Lys Leu Met Gly
580 585 590

Thr Thr Asn Gln Ile Pro Val Phe Ile Val Met Gly Leu Tyr Ile Cys
595 600 605

Met Tyr Ala Val Phe Ala Val Thr Ala Tyr Asn His Ser Lys Arg Thr
610 615 620

Ile Arg His Ser Ile
625

<210> 120
<211> 629
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

<220>
<221> característica_misc
<222> (1)..(45)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (213)..(213)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (231)..(231)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (368)..(368)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (370)..(370)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (384)..(384)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (414)..(414)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (486)..(486)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (494)..(494)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (576)..(576)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<400> 120

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Met Thr Glu
35 40 45

Ser Tyr Pro Ile Ile Lys Glu Gly Ser Gln Val Gly Ser Tyr Phe Leu
50 55 60

Phe Phe Ile Ile Ile Ala Phe Leu Leu Tyr Ala Asn Val Leu Phe Ile
65 70 75 80

```
Lys Arg Arg Ser Tyr Glu Leu Ala Leu Tyr Gln Thr Leu Gly Leu Ser
                85                  90                  95

Lys Phe Asn Ile Ile Tyr Ile Leu Met Leu Glu Gln Leu Leu Ile Phe
            100                 105                 110

Ile Ile Thr Ala Ile Leu Gly Ile Ile Ile Gly Ile Phe Gly Ser Lys
        115                 120                 125

Leu Leu Leu Met Ile Val Phe Thr Leu Leu Gly Ile Lys Glu Lys Val
    130                 135                 140

Pro Ile Ile Phe Ser Leu Arg Ala Val Phe Glu Thr Leu Met Leu Ile
145                 150                 155                 160

Gly Val Ala Tyr Phe Leu Thr Ser Ala Gln Asn Phe Ile Leu Val Phe
                165                 170                 175

Lys Gln Ser Ile Ser Gln Met Ser Lys Asn Asn Gln Val Lys Glu Thr
            180                 185                 190

Asn His Asn Lys Ile Thr Phe Glu Glu Val Val Leu Gly Ile Leu Gly
        195                 200                 205

Ile Val Leu Ile Xaa Thr Gly Tyr Tyr Leu Ser Leu Asn Ile Val Gln
    210                 215                 220

Tyr Tyr Asp Ser Ile Gly Xaa Leu Met Phe Ile Leu Leu Ser Thr Val
225                 230                 235                 240

Ile Gly Ala Tyr Leu Phe Phe Lys Ser Ser Val Ser Leu Val Phe Lys
                245                 250                 255

Met Val Lys Lys Phe Arg Lys Gly Val Ile Ser Val Asn Asp Val Met
            260                 265                 270

Phe Ser Ser Ser Ile Met Tyr Arg Ile Lys Lys Asn Ala Phe Ser Leu
        275                 280                 285

Thr Val Met Ala Ile Ile Ser Ala Ile Thr Val Ser Val Leu Cys Phe
    290                 295                 300
```

```
Ala Ala Ile Ser Arg Ala Ser Leu Ser Ser Glu Ile Lys Tyr Thr Ala
305                 310                 315                 320

Pro His Asp Val Thr Ile Lys Asp Gln Gln Lys Ala Asn Gln Leu Ala
                325                 330                 335

Ser Glu Leu Asn Asn Gln Lys Ile Pro His Phe Tyr Asn Tyr Lys Glu
            340                 345                 350

Val Ile His Thr Lys Leu Tyr Lys Asp Asn Leu Phe Asp Val Lys Xaa
        355                 360                 365

Lys Xaa Pro Tyr Asn Val Thr Ile Thr Ser Asp Lys Tyr Ile Pro Xaa
    370                 375                 380

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

Ile Lys Asp Leu Val Lys His Lys Lys His Gly Lys Ala Xaa Ile Gly
                405                 410                 415

Thr Lys Lys His His Val Asn Ile Lys Leu Arg Lys Asp Ile Asn Lys
            420                 425                 430

Ile Tyr Phe Met Thr Asp Val Asp Leu Gly Gly Pro Thr Phe Val Leu
        435                 440                 445

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

Ile Val Ser Gln Phe Gly Phe Asp Leu Lys His Lys Lys Asp Ala Leu
465                 470                 475                 480

Ala Leu Glu Lys Ala Xaa Asn Lys Val Asp Lys Ser Ile Xaa Thr Arg
                485                 490                 495

Ser Glu Ala Ile Ser Ser Ile Ser Ser Leu Thr Gly Ile Leu Leu Phe
            500                 505                 510
```

```
Val Thr Ser Phe Leu Gly Ile Thr Phe Leu Ile Ala Val Cys Cys Ile
        515                 520                 525

Ile Tyr Ile Lys Gln Ile Asp Glu Thr Glu Asp Glu Leu Glu Asn Tyr
    530                 535                 540

Ser Ile Leu Arg Lys Leu Gly Phe Thr Gln Lys Asp Met Ala Arg Gly
545                 550                 555                 560

Leu Lys Phe Lys Ile Met Phe Asn Phe Gly Leu Pro Leu Val Ile Xaa
                565                 570                 575

Leu Ser His Ala Tyr Phe Thr Ser Leu Ala Tyr Met Lys Leu Met Gly
            580                 585                 590

Thr Thr Asn Gln Ile Pro Val Phe Ile Val Met Gly Leu Tyr Ile Cys
        595                 600                 605

Met Tyr Ala Val Phe Ala Val Thr Ala Tyr Asn His Ser Lys Arg Thr
    610                 615                 620

Ile Arg His Ser Ile
625
```

<210> 121
<211> 55
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 121

```
Met Leu Glu Ser Arg Glu Gln Leu Ser Val Glu Glu Tyr Glu Thr Phe
1               5                   10                  15

Phe Asn Arg Phe Asp Asn Gln Glu Phe Asp Phe Glu Arg Glu Leu Thr
            20                  25                  30

Gln Asp Pro Tyr Ser Lys Val Tyr Leu Tyr Ser Ile Glu Asp His Ile
        35                  40                  45

Arg Thr Tyr Lys Ile Glu Lys
    50                  55
```

<210> 122
<211> 55
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 122

```
Met Leu Glu Ser Arg Glu Gln Leu Ser Val Glu Glu Tyr Glu Thr Phe
1               5                  10                  15


Phe Asn Arg Phe Asp Asn Gln Glu Phe Asp Phe Glu Arg Glu Leu Thr
            20                  25                  30


Gln Asp Pro Tyr Ser Lys Val Tyr Leu Tyr Ser Ile Glu Asp His Ile
        35                  40                  45


Arg Thr Tyr Lys Ile Glu Lys
    50                  55
```

<210> 123
<211> 88
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 123

```
Cys Leu Phe Ser Tyr Gly Ser Gly Ala Val Gly Glu Ile Phe Ser Gly
1               5                  10                  15


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


Asn Met Leu Glu Ser Arg Glu Gln Leu Ser Val Glu Glu Tyr Glu Thr
        35                  40                  45


Phe Phe Asn Arg Phe Asp Asn Gln Glu Phe Asp Phe Glu Arg Glu Leu
    50                  55                  60


Thr Gln Asp Pro Tyr Ser Lys Val Tyr Leu Tyr Ser Ile Glu Asp His
65                  70                  75                  80


Ile Arg Thr Tyr Lys Ile Glu Lys
                85
```

<210> 124
<211> 88
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 124

Cys Leu Phe Ser Tyr Gly Ser Gly Ala Val Gly Glu Ile Phe Ser Gly
1 5 10 15

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

Asn Met Leu Glu Ser Arg Glu Gln Leu Ser Val Glu Glu Tyr Glu Thr
35 40 45

Phe Phe Asn Arg Phe Asp Asn Gln Glu Phe Asp Phe Glu Arg Glu Leu
50 55 60

Thr Gln Asp Pro Tyr Ser Lys Val Tyr Leu Tyr Ser Ile Glu Asp His
65 70 75 80

Ile Arg Thr Tyr Lys Ile Glu Lys
85

<210> 125
<211> 88
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 125

Cys Leu Phe Ser Tyr Gly Ser Gly Ala Val Gly Glu Ile Phe Ser Gly
1 5 10 15

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

Asn Met Leu Glu Ser Arg Glu Gln Leu Ser Val Glu Glu Tyr Glu Thr
35 40 45

Phe Phe Asn Arg Phe Asp Asn Gln Glu Phe Asp Phe Glu Arg Glu Leu
50 55 60

```
Thr Gln Asp Pro Tyr Ser Lys Val Tyr Leu Tyr Ser Ile Glu Asp His
65                  70                  75                  80


Ile Arg Thr Tyr Lys Ile Glu Lys
                85
```

<210> 126
<211> 78
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 126

```
Gly Glu Phe Tyr Ser Ala Thr Leu Val Glu Gly Tyr Lys Asp His Leu
1               5                   10                  15


Asp Gln Ala Ala His Lys Ala Leu Leu Asn Asn Arg Thr Glu Val Ser
            20                  25                  30


Val Asp Ala Tyr Glu Thr Phe Phe Lys Arg Phe Asp Asp Val Asp Phe
        35                  40                  45


Asp Glu Gln Gln Asp Ala Val His Glu Asp Arg Arg Ile Phe Tyr Leu
    50                  55                  60


Ser Asn Ile Glu Asn Asn Val Arg Glu Tyr His Arg Pro Glu
65                  70                  75
```

<210> 127
<211> 88
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 127

```
Gly Leu Phe Ser Tyr Gly Ser Gly Ser Val Gly Glu Phe Tyr Ser Ala
1               5                   10                  15


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


Ala Leu Leu Asn Asn Arg Thr Glu Val Ser Val Asp Ala Tyr Glu Thr
        35                  40                  45
```

```
Phe Phe Lys Arg Phe Asp Asp Val Asp Phe Asp Glu Gln Gln Asp Ala
    50                  55                  60

Val His Glu Asp Arg Arg Ile Phe Tyr Leu Ser Asn Ile Glu Asn Asn
65                  70                  75                  80

Val Arg Glu Tyr His Arg Pro Glu
                85
```

<210> 128
<211> 78
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 128

```
Gly Glu Phe Tyr Ser Ala Thr Leu Val Glu Gly Tyr Lys Asp His Leu
1               5                   10                  15

Asp Gln Ala Ala His Lys Ala Leu Leu Asn Asn Arg Thr Glu Val Ser
            20                  25                  30

Val Asp Ala Tyr Glu Thr Phe Phe Lys Arg Phe Asp Asp Val Asp Phe
        35                  40                  45

Asp Glu Glu Gln Asp Ala Val His Glu Asp Arg His Ile Phe Tyr Leu
    50                  55                  60

Ser Asn Ile Glu Asn Asn Val Arg Glu Tyr His Arg Pro Glu
65                  70                  75
```

<210> 129
<211> 88
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 129

```
Gly Leu Phe Ser Tyr Gly Ser Gly Ser Val Gly Glu Phe Tyr Ser Ala
1               5                   10                  15

Thr Leu Val Glu Gly Tyr Lys Asp His Leu Asp Gln Ala Ala His Lys
            20                  25                  30
```

```
Ala Leu Leu Asn Asn Arg Thr Glu Val Ser Val Asp Ala Tyr Glu Thr
        35                  40                  45

Phe Phe Lys Arg Phe Asp Asp Val Glu Phe Asp Glu Glu Gln Asp Ala
    50                  55                  60

Val His Glu Asp Arg His Ile Phe Tyr Leu Ser Asn Ile Glu Asn Asn
65                  70                  75                  80

Val Arg Glu Tyr His Arg Pro Glu
                85
```

<210> 130
<211> 88
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 130

```
Gly Leu Phe Ser Tyr Gly Ser Gly Ser Val Gly Glu Phe Tyr Ser Ala
1               5                   10                  15

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

Ala Leu Leu Asn Asn Arg Thr Glu Val Ser Val Asp Ala Tyr Glu Thr
        35                  40                  45

Phe Phe Lys Arg Phe Asp Asp Val Glu Phe Asp Glu Glu Gln Asp Ala
    50                  55                  60

Val His Glu Asp Arg His Ile Phe Tyr Leu Ser Asn Ile Glu Asn Asn
65                  70                  75                  80

Val Arg Glu Tyr His Arg Pro Glu
                85
```

<210> 131
<211> 88
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintética

<220>
<221> característica_misc
<222> (1)..(34)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (36)..(37)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (39)..(41)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (44)..(45)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (51)..(51)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (55)..(57)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (60)..(72)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (75)..(76)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (79)..(81)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (83)..(83)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>

<221> característica_misc
<222> (85)..(88)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<400> 131

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Ser Val Xaa Xaa Tyr Glu Thr
35 40 45

Phe Phe Xaa Arg Phe Asp Xaa Xaa Xaa Phe Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
50 55 60

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Leu Xaa Xaa Ile Glu Xaa Xaa
65 70 75 80

Xaa Arg Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa
85

<210> 132
<211> 14
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 132

Glu Ser Arg Glu Gln Leu Ser Val Glu Glu Tyr Glu Thr Phe
1 5 10

<210> 133
<211> 14
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 133

Asn Asn Arg Thr Glu Val Ser Val Asp Ala Tyr Glu Thr Phe
1 5 10

<210> 134
<211> 14

<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 134

Asn Gln Glu Phe Asp Phe Glu Arg Glu Leu Thr Gln Asp Pro
1 5 10

<210> 135
<211> 14
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 135

Asp Val Asp Phe Asp Glu Gln Gln Asp Ala Val His Glu Asp
1 5 10

<210> 136
<211> 14
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 136

Asp Val Asp Phe Asp Glu Glu Gln Asp Ala Val His Glu Asp
1 5 10

<210> 137
<211> 14
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 137

Asp Val Glu Phe Asp Glu Glu Gln Asp Ala Val His Glu Asp
1 5 10

<210> 138
<211> 14
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

<220>
<221> característica_misc
<222> (1)..(2)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (4)..(6)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (9)..(10)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<400> 138

Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Ser Val Xaa Xaa Tyr Glu Thr Phe
1 5 10

<210> 139
<211> 14
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

<220>
<221> característica_misc
<222> (1)..(3)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (6)..(14)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<400> 139

Xaa Xaa Xaa Phe Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 140
<211> 720
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 140
ttattgttca atgtgctttt gaataaaatc tttgatttga ggcgtaaagt atacggcacc
60

attatattca gaaccaattt ttccaatacc gccatacacc acacctatga cctcattgtt
120

agaatttaga actggtgatc ctgaattccc gggttcaatg tatgcatcaa aatttaaaat
180

attgtctttg attcttttta tagttcctgt agattcaaac tgtttaaaac tattttgagc
240

aggtaatggg taaccaataa ctttaatttt gtcatcaact ttagcatctt tcgcaaaatt
300

taatgcttgg acattttcat taaaattaaa gccttttggt ccacgttcaa ctgcttgttc
360

ttcaatattc atgacagaga tgtcttcatc acccggataa tcagaaatgc ttttaatttt
420

atatatacca ccatttcctt tgtcaccgtc tggatgggca gtaattctat cgccaacttt
480

ataatctttt gatacatgtt tattggtgat aattgtattt tttccaatta caaaacctgt
540

cgcatcttta aatgaaacga cgccattata tggaaaaata tttgtatctt taacttgcgt
600

aacattcttc tctgcatttg ctatttgttg tgtctcttca acgactgcag catttattcc
660

agttactgag gttagaatgg ctaatgctgc catgctttta atgactatat ttttattcat
720

<210> 141
<211> 720
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 141
ttattgttca atgtgctttt gaataaaatc tttgatttga ggcgtaaagt atacggcacc
60

attatattca gaaccaattt ttccaatacc gccatacacc acacctatga cctcattgtt
120

agaatttaga actggtgatc ctgaattccc gggttcaatg tatgcatcaa aatttaaaat
180

attgtctttg attcttttta tagttcctgt agattcaaac tgtttaaaac tattttgagc
240

aggtaatggg taaccaataa ctttaatttt gtcatcaact ttagcatctt tcgcaaaatt
300

taatgcttgg acattttcat taaaattaaa gccttttggt ccacgttcaa ctgcttgttc
360

ttcaatattc atgacagaga tgtcttcatc acccggataa tcagaaatgc ttttaatttt
420

atatatacca ccatttcctt tgtcaccgtc tggatgggca gtaattctat cgccaacttt
480

ataatctttt gatacatgtt tattggtgat aattgtattt tttccaatta caaaacctgt
540

cgcatcttta aatgaaacga cgccattata tggaaaaata tttgtatctt taacttgcgt
600

aacattcttc tctgcatttg ctatttgttg tgtctcttca acgactgcag catttattcc
660

agttgctgag gttagaatgg ctaatgctgc catgctttta atgactatat ttttattcat
720

<210> 142
<211> 740
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 142
ttattgttca atgtgctttt gaataaaatc tttgatttga ggcgtaaagt atacggcacc
60

attatattca gaaccaattt ttccaatacc gccatacacc acacctatga cctcattgtt
120

agaatttaga actggtgatc ctgaattccc gggttcaatg tatgcatcaa aatttaaaat
180

attgtctttg attcttttta tagttcctgt agattcaaac tgtttaaaac tattttgagc
240

aggtaatggg taaccaataa ctttaatttt gtcatcaact ttagcatctt tcgcaaaatt
300

gaatgcttgg acattttcat taaaattaaa gccttttggt ccacgttcga ctgcttgttc
360

ttcaatattc atgacagaga tgtcttcatc acccggataa tcagaaatgc ttttaatttt
420

atatatacca ccatttcctt tgtcaccgtt tggatgggca gtaattctat cgccaacttt
480

ataatctttt gatacatgtt tattggtgat aattgtattt tttccaatta caaaacctgt
540

cgcatcttta aatgaaacga cgccattata tggaaaaata tttgtatctt taacttgcgt
600

aacattcttc tctgcatttg ctatttgttg tgtctcttca acgactgcag catttattcc
660

agttactgag gttagaatgg ctaatgctgc catgctttta atgactatat ttttattcat
720

aaaagcacat tgaacaataa
740

<210> 143
<211> 720
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 143
ttattgttca atgtgctttt gaataaaatc tttgatttga ggcgtaaagt atacggcacc
60

attatattca gaaccaattt ttccaatacc gccatacacc acacctatga cctcattgtt
120

agaatttaga actggtgatc ctgaattccc gggttcaatg tatgcatcaa aatttaaaat
180

attgtctttg attcttttta tagttcctgt agattcaaac tgtttaaaac tattttgagc
240

aggtaatggg taaccaataa ctttaatttt gtcatcaact ttagcatctt tcgcaaaatt
300

gaatgcttgg acattttcat taaaattaaa gccttttggt ccacgttcga ctgcttgttc
360

ttcaatattc atgacagaga tgtcttcatc acccggataa tcagaaatgc ttttaatttt
420

atatatacca ccatttcctt tgtcaccgtt tggatgggca gtaattctat cgccaacttt
480

ataatctttt gatacatgtt tattggtgat aattgtattt tttccaatta caaaacctgt
540

cgcatcttta aatgaaacga cgccattata tggaaaaata tttgtatctt taacttgcgt
600

aacattcttc tctgcatttg ctatttgttg tgtctcttca acgactgcag catttattcc
660

agttactgag gttagaatgg ctaatgctgc catgctttta atgactatat ttttattcat
720

<210> 144
<211> 720
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 144
ttattgttca atgtgctttt gaataaaatc tttgatttga ggcgtaaagt atacggcacc
60

attatattca gaaccaattt ttccaatacc gccatacacc acacctatga cctcattgtt
120

agaatttaga actggtgatc ctgaattccc gggttcaatg tatgcatcaa aatttaaaat
180

attgtctttg attcttttta tagttcctgt agattcaaac tgtttaaaac tattttgagc
240

aggtaatggg taaccaataa ctttaatttt gtcatcaact ttagcatctt tcgcaaaatt
300

taatgcttgg acattttcat taaaattaaa gccttttggt ccacgttcga ctgcttgttc
360

ttcaatattc atgacagaga tgtcttcatc acccggataa tcagaaatgc ttttaatttt
420

atatatacca ccatttcctt tgtcaccgtt tggatgggca gtaattctat cgccaacttt
480

ataatctttt gatacatgtt tattggtgat aattgtattt tttccaatta caaaacctgt
540

cgcatcttta aatgaaacga cgccattata tggaaaaata tttgtatctt taacttgcgt
600

aacattcttc tctgcatttg ctatttgttg tgtctcttca acgactgcag catttattcc
660

agttactgag gttagaatgg ctaatgctgc catgctttta atgactatat ttttattcat
720

<210> 145
<211> 720
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 145

ttattgttca atgtgctttt gaataaaatc tttgatttga ggcgtaaagt atacggcacc
60

attatattca gaaccaattt ttccaatacc gccatacacc acacctatga cctcattgtt
120

agaatttaga actggtgatc ctgaattccc gggttcaatg tatgcatcaa aatttaaaat
180

attgtctttg attcttttta tagttcctgt agattcaaac tgtttaaaac tattttgagc
240

aggtaatggg taaccaataa ctttaatttt gtcatcaact ttagcatctt tcgcaaaatt
300

gaatgcttgg acattttcat taaaattaaa gccttttggt ccacgttcga ctgcttgttc
360

ttcaatattc atgacagaga tgtcttcatc acccggataa tcagaaatgc ttttaatttt
420

atatatacca ccatttcctt tgtcaccgtt tggatgggca gtaattctat cgccaacttt
480

ataatctttt gatacatgtt tattggtgat aattgtattt tttccaatta caaaacctgt
540

cgcatcttta aatgaaacga cgccattata tggaaaaata tttgtatctt taacttgcgt
600

aacattcttc tctgcatttg ctatttgttg tgtctcttca acgactgcag catttattcc
660

agttactgag gttagaatgg ctaatgctgc catgctttta atgactatat ttttattcat
720

<210> 146
<211> 720
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 146
ttattgttca atgtgctttt gaataaaatc tttgatttga ggcgtaaagt atacggcacc
60

attatattca gaaccaattt ttccaatacc gccatacacc acacctatga cctcattgtt
120

agaatttaga actggtgatc ctgaattccc gggttcaatg tatgcatcaa aatttaaaat
180

attgtctttg attcttttta tagttcctgt agattcaaac tgtttaaaac tattttgagc
240

aggtaatggg taaccaataa ctttaatttt gtcatcaact ttagcatctt tcgcaaaatt
300

gaatgcttgg acattttcat taaaattaaa gccttttggt ccacgttcaa ctgcttgttc
360

ttcaatattc atgacagaga tgtcttcatc acccggataa tcagaaatgc ttttaatttt
420

atatatacca ccatttcctt tgtcaccgtt tggatgggca gtaattctat cgccaacttt
480

ataatctttt gatacatgtt tattggtgat aattgtattt tttccaatta caaaacctgt
540

cgcatcctta aatgaaacga cgccattata tggaaaatta tttgtatctt taacttgcgt
600

aacattcttc tctgcatttg ctatttgttg tgtctcttca acgactgcag catttattcc
660

agttactgag gttagaatgg ctaatgctgc catgctttta atgactatat ttttattcat
720

<210> 147
<211> 720
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 147
ttattgttca atgtgctttt gaataaaatc tttgatttga ggcgtaaagt atacggcacc
60

attatattca gaaccaattt ttccaatacc gccatacacc acacctatga cctcattgtt
120

agaatttaga actggtgatc ctgaattccc gggttcaatg tatgcatcaa aatttaaaat
180

attgtctttg attcttttta tagttcctgt agattcaaac tgtttaaaac tattttgagc
240

aggtaatggg taaccaataa ctttaatttt gtcatcaact ttagcatctt tcgcaaaatt
300

gaatgcttgg acattttcat taaaattaaa gccttttggt ccacgttcaa ctgcttgttc
360

ttcaatattc atgacagaga tgtcttcatc acccggataa tcagaaatgc ttttaatttt
420

atatatacca ccatttcctt tgtcaccgtt tggatgggca gtaattctat cgccaacttt
480

ataatctttt gatacatgtt tattggtgat aattgtattt tttccaatta caaaacctgt
540

cgcatcctta aatgaaacga cgccattata tggaaaatta tttgtatctt taacttgcgt
600

aacattcttc tctgcatttg ctatttgttg tgtctcttca acgactgcag catttattcc
660

agttactgag gttagaatgg ctaatgctgc catgctttta atgactatat ttttattcat
720

<210> 148
<211> 720
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 148
ttattgttca atgtgctttt gaataaaatc tttgatttga ggcgtaaagt atacggcacc
60

attatattca gaaccaattt ttccaatacc gccatacacc acacctatga cctcattgtt
120

agaatttaga actggtgatc ctgaattccc gggttcaatg tatgcatcaa aatttaaaat
180

attgtctttg attcttttta tagttcctgt agattcaaac tgtttaaaac tattttgagc
240

aggtaatggg taaccaataa ctttaatttt gtcatcaact ttagcatctt tcgcaaaatt
300

gaatgcttgg acattttcat taaaattaaa gccttttggt ccacgttcaa ctgcttgttc
360

ttcaatattc atgacagaga tgtcttcatc acccggataa tcagaaatgc ttttaatttt
420

atatatacca ccatttcctt tgtcaccgtt tggatgggca gtaattctat cgccaacttt
480

ataatctttt gatacatgtt tattggtgat aattgtattt tttccaatta caaaacctgt
540

cgcatcctta aatgaaacga cgccattata tggaaaatta tttgtatctt taacttgcgt
600

aacattcttc tctgcatttg ctatttgttg tgtctcttca acgactgcag catttattcc
660

agttactgag gttagaatgg ctaatgctgc catgctttta atgactatat ttttattcat
720

<210> 149
<211> 720
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 149
ttattgttca atgtgctttt gaataaaatc tttgatttga ggcgtaaagt atacggcacc
60

attatattca gaaccaattt ttccaatacc gccatacacc acacctatga cctcattgtt
120

agaatttaga actggtgatc ctgaattccc gggttcaatg tatgcatcaa aatttaaaat
180

attgtctttg attcttttta tagttcctgt agattcaaac tgtttaaaac tattttgagc
240

aggtaatggg taaccaataa ctttaatttt gtcatcaact ttagcatctt tcgcaaaatt
300

gaatgcttgg acattttcat taaaattaaa gccttttggt ccacgttcaa ctgcttgttc
360

ttcaatattc atgacagaga tgtcttcatc acccggataa tcagaaatgc ttttaatttt
420

atatatacca ccatttcctt tgtcaccgtt tggatgggca gtaattctat cgccaacttt
480

ataatctttt gatacatgtt tattggtgat aattgtattt tttccaatta caaaacctgt
540

cgcatcctta aatgaaacga cgccattata tggaaaatta tttgtatctt taacttgcgt
600

aacattcttc tctgcatttg ctatttgttg tgtctcttca acgactgcag catttattcc
660

agttactgag gttagaatgg ctaatgctgc catgctttta atgactatat ttttattcat
720

<210> 150
<211> 720
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 150

ttattgttca atgtgctttt gaataaaatc tttgatttga ggcgtaaagt atacggcacc
60

attatattca gaaccaattt ttccaatacc gccatacacc acacctatga cctcattgtt
120

agaatttaga actggtgatc ctgaattccc gggttcaatg tatgcatcaa aatttaaaat
180

attgtctttg attcttttta tagttcctgt agattcaaac tgtttaaaac tattttgagc
240

aggtaatggg taaccaataa ctttaatttt gtcatcaact ttagcatctt tcgcaaaatt
300

gaatgcttgg acattttcat taaaattaaa gccttttggt ccacgttcaa ctgcttgttc
360

ttcaatattc atgacagaga tgtcttcatc acccggataa tcagaaatgc ttttaatttt
420

atatatacca ccatttcctt tgtcaccgtt tggatgggca gtaattctat cgccaacttt
480

ataatctttt gatacatgtt tattggtgat aattgtattt tttccaatta caaaacctgt
540

cgcatcctta aatgaaacga cgccattata tggaaaatta tttgtatctt taacttgcgt
600

aacattcttc tctgcatttg ctatttgttg tgtctcttca acgactgcag catttattcc
660

agttactgag gttagaatgg ctaatgctgc catgctttta atgactatat ttttattcat
720

<210> 151
<211> 720
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 151
ttattgttca atgtgctttt gaataaattc tttgatttga ggcgtaaaat aaactgcacc
60

attgtattct gatccgattt ttccaatacc tccatacaca actcctacga cttcattatt
120

taaatttaaa actggggatc ctgaatttcc aggctcgata tatgcatcaa aatttaaatt
180

attatcttta atacttttta cagttccagt tgattcaaat tgtttgaatg tattttgagc
240

tggtaaaggg tatccaataa ctttaatttt gtcgtcaact ttagcatctt tcgcaaaatt
300

gaatgcttgg acattttcat taaaattata accatttgct ccacgttcaa cagcattttc
360

ttcaacgttc attactgata tatcctcatt acctggataa tcagaaatat ttttaatttt
420

ataaattcca ccgttgcctt tgtcaccatt tgggtgggca gtaattctat cgccaacttt
480

atagtccttt gatacatgtt tattggtgat aattgtattt ttttcaattg caaaacctgt
540

cgcatcttta aatgaaacga cgccattata tggaaaaaca tttgtatctt taacttgcgt
600

aacattcttc tctgcatttg ctatttgttg tgtctcatca acgactgcag catttattcc
660

agttactgag gttagaatgg ctaatgctgc catgctttta atgactatat ttttattcat
720

<210> 152
<211> 239
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 152

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

Thr Ser Val Thr Gly Ile Asn Ala Ala Val Val Glu Glu Thr Gln Gln
20 25 30

Ile Ala Asn Ala Glu Lys Asn Val Thr Gln Val Lys Asp Thr Asn Ile
35 40 45

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

Ile Gly Lys Asn Thr Ile Ile Thr Asn Lys His Val Ser Lys Asp Tyr
65 70 75 80

Lys Val Gly Asp Arg Ile Thr Ala His Pro Asp Gly Asp Lys Gly Asn

```
                85                  90                  95

Gly Gly Ile Tyr Lys Ile Lys Ser Ile Ser Asp Tyr Pro Gly Asp Glu
            100                 105                 110

Asp Ile Ser Val Met Asn Ile Glu Glu Gln Ala Val Glu Arg Gly Pro
        115                 120                 125

Lys Gly Phe Asn Phe Asn Glu Asn Val Gln Ala Leu Asn Phe Ala Lys
    130                 135                 140

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

Ala Gln Asn Ser Phe Lys Gln Phe Glu Ser Thr Gly Thr Ile Lys Arg
                165                 170                 175

Ile Lys Asp Asn Ile Leu Asn Phe Asp Ala Tyr Ile Glu Pro Gly Asn
            180                 185                 190

Ser Gly Ser Pro Val Leu Asn Ser Asn Asn Glu Val Ile Gly Val Val
        195                 200                 205

Tyr Gly Gly Ile Gly Lys Ile Gly Ser Glu Tyr Asn Gly Ala Val Tyr
    210                 215                 220

Phe Thr Pro Gln Ile Lys Asp Phe Ile Gln Lys His Ile Glu Gln
225                 230                 235
```

<210> 153
<211> 239
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 153

```
Met Asn Lys Asn Ile Val Ile Lys Ser Met Ala Ala Leu Ala Ile Leu
1               5                   10                  15

Thr Ser Ala Thr Gly Ile Asn Ala Ala Val Val Glu Glu Thr Gln Gln
            20                  25                  30
```

```
Ile Ala Asn Ala Glu Lys Asn Val Thr Gln Val Lys Asp Thr Asn Ile
        35                  40                  45

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

Ile Gly Lys Asn Thr Ile Ile Thr Asn Lys His Val Ser Lys Asp Tyr
65                  70                  75                  80

Lys Val Gly Asp Arg Ile Thr Ala His Pro Asp Gly Asp Lys Gly Asn
                85                  90                  95

Gly Gly Ile Tyr Lys Ile Lys Ser Ile Ser Asp Tyr Pro Gly Asp Glu
            100                 105                 110

Asp Ile Ser Val Met Asn Ile Glu Glu Gln Ala Val Glu Arg Gly Pro
        115                 120                 125

Lys Gly Phe Asn Phe Asn Glu Asn Val Gln Ala Leu Asn Phe Ala Lys
    130                 135                 140

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

Ala Gln Asn Ser Phe Lys Gln Phe Glu Ser Thr Gly Thr Ile Lys Arg
                165                 170                 175

Ile Lys Asp Asn Ile Leu Asn Phe Asp Ala Tyr Ile Glu Pro Gly Asn
            180                 185                 190

Ser Gly Ser Pro Val Leu Asn Ser Asn Asn Glu Val Ile Gly Val Val
        195                 200                 205

Tyr Gly Gly Ile Gly Lys Ile Gly Ser Glu Tyr Asn Gly Ala Val Tyr
    210                 215                 220

Phe Thr Pro Gln Ile Lys Asp Phe Ile Gln Lys His Ile Glu Gln
225                 230                 235
```

<210> 154
<211> 239

<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 154

```
Met Asn Lys Asn Ile Val Ile Lys Ser Met Ala Ala Leu Ala Ile Leu
1               5                  10                  15

Thr Ser Val Thr Gly Ile Asn Ala Ala Val Val Glu Glu Thr Gln Gln
            20                  25                  30

Ile Ala Asn Ala Glu Lys Asn Val Thr Gln Val Lys Asp Thr Asn Ile
        35                  40                  45

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

Ile Gly Lys Asn Thr Ile Ile Thr Asn Lys His Val Ser Lys Asp Tyr
65                  70                  75                  80

Lys Val Gly Asp Arg Ile Thr Ala His Pro Asn Gly Asp Lys Gly Asn
                85                  90                  95

Gly Gly Ile Tyr Lys Ile Lys Ser Ile Ser Asp Tyr Pro Gly Asp Glu
            100                 105                 110

Asp Ile Ser Val Met Asn Ile Glu Glu Gln Ala Val Glu Arg Gly Pro
        115                 120                 125

Lys Gly Phe Asn Phe Asn Glu Asn Val Gln Ala Phe Asn Phe Ala Lys
    130                 135                 140

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

Ala Gln Asn Ser Phe Lys Gln Phe Glu Ser Thr Gly Thr Ile Lys Arg
                165                 170                 175

Ile Lys Asp Asn Ile Leu Asn Phe Asp Ala Tyr Ile Glu Pro Gly Asn
            180                 185                 190

Ser Gly Ser Pro Val Leu Asn Ser Asn Asn Glu Val Ile Gly Val Val
```

195 200 205

Tyr Gly Gly Ile Gly Lys Ile Gly Ser Glu Tyr Asn Gly Ala Val Tyr
210 215 220

Phe Thr Pro Gln Ile Lys Asp Phe Ile Gln Lys His Ile Glu Gln
225 230 235

<210> 155
<211> 239
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 155

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

Thr Ser Val Thr Gly Ile Asn Ala Ala Val Val Glu Glu Thr Gln Gln
20 25 30

Ile Ala Asn Ala Glu Lys Asn Val Thr Gln Val Lys Asp Thr Asn Ile
35 40 45

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

Ile Gly Lys Asn Thr Ile Ile Thr Asn Lys His Val Ser Lys Asp Tyr
65 70 75 80

Lys Val Gly Asp Arg Ile Thr Ala His Pro Asn Gly Asp Lys Gly Asn
85 90 95

Gly Gly Ile Tyr Lys Ile Lys Ser Ile Ser Asp Tyr Pro Gly Asp Glu
100 105 110

Asp Ile Ser Val Met Asn Ile Glu Glu Gln Ala Val Glu Arg Gly Pro
115 120 125

Lys Gly Phe Asn Phe Asn Glu Asn Val Gln Ala Phe Asn Phe Ala Lys
130 135 140

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

Ala Gln Asn Ser Phe Lys Gln Phe Glu Ser Thr Gly Thr Ile Lys Arg
                165                 170                 175

Ile Lys Asp Asn Ile Leu Asn Phe Asp Ala Tyr Ile Glu Pro Gly Asn
            180                 185                 190

Ser Gly Ser Pro Val Leu Asn Ser Asn Asn Glu Val Ile Gly Val Val
        195                 200                 205

Tyr Gly Gly Ile Gly Lys Ile Gly Ser Glu Tyr Asn Gly Ala Val Tyr
    210                 215                 220

Phe Thr Pro Gln Ile Lys Asp Phe Ile Gln Lys His Ile Glu Gln
225                 230                 235
```

<210> 156
<211> 239
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 156

```
Met Asn Lys Asn Ile Val Ile Lys Ser Met Ala Ala Leu Ala Ile Leu
1               5                   10                  15

Thr Ser Val Thr Gly Ile Asn Ala Ala Val Val Glu Glu Thr Gln Gln
            20                  25                  30

Ile Ala Asn Ala Glu Lys Asn Val Thr Gln Val Lys Asp Thr Asn Ile
        35                  40                  45

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

Ile Gly Lys Asn Thr Ile Ile Thr Asn Lys His Val Ser Lys Asp Tyr
65                  70                  75                  80

Lys Val Gly Asp Arg Ile Thr Ala His Pro Asn Gly Asp Lys Gly Asn
                85                  90                  95
```

```
Gly Gly Ile Tyr Lys Ile Lys Ser Ile Ser Asp Tyr Pro Gly Asp Glu
            100                 105                 110

Asp Ile Ser Val Met Asn Ile Glu Glu Gln Ala Val Glu Arg Gly Pro
        115                 120                 125

Lys Gly Phe Asn Phe Asn Glu Asn Val Gln Ala Phe Asn Phe Ala Lys
    130                 135                 140

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

Ala Gln Asn Ser Phe Lys Gln Phe Glu Ser Thr Gly Thr Ile Lys Arg
                165                 170                 175

Ile Lys Asp Asn Ile Leu Asn Phe Asp Ala Tyr Ile Glu Pro Gly Asn
            180                 185                 190

Ser Gly Ser Pro Val Leu Asn Ser Asn Asn Glu Val Ile Gly Val Val
        195                 200                 205

Tyr Gly Gly Ile Gly Lys Ile Gly Ser Glu Tyr Asn Gly Ala Val Tyr
    210                 215                 220

Phe Thr Pro Gln Ile Lys Asp Phe Ile Gln Lys His Ile Glu Gln
225                 230                 235
```

<210> 157
<211> 239
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 157

```
Met Asn Lys Asn Ile Val Ile Lys Ser Met Ala Ala Leu Ala Ile Leu
1               5                   10                  15

Thr Ser Val Thr Gly Ile Asn Ala Ala Val Val Glu Glu Thr Gln Gln
            20                  25                  30

Ile Ala Asn Ala Glu Lys Asn Val Thr Gln Val Lys Asp Thr Asn Ile
        35                  40                  45
```

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

Ile Gly Lys Asn Thr Ile Ile Thr Asn Lys His Val Ser Lys Asp Tyr
65                  70                  75                  80

Lys Val Gly Asp Arg Ile Thr Ala His Pro Asn Gly Asp Lys Gly Asn
                85                  90                  95

Gly Gly Ile Tyr Lys Ile Lys Ser Ile Ser Asp Tyr Pro Gly Asp Glu
            100                 105                 110

Asp Ile Ser Val Met Asn Ile Glu Glu Gln Ala Val Glu Arg Gly Pro
        115                 120                 125

Lys Gly Phe Asn Phe Asn Glu Asn Val Gln Ala Phe Asn Phe Ala Lys
    130                 135                 140

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

Ala Gln Asn Ser Phe Lys Gln Phe Glu Ser Thr Gly Thr Ile Lys Arg
                165                 170                 175

Ile Lys Asp Asn Ile Leu Asn Phe Asp Ala Tyr Ile Glu Pro Gly Asn
            180                 185                 190

Ser Gly Ser Pro Val Leu Asn Ser Asn Asn Glu Val Ile Gly Val Val
        195                 200                 205

Tyr Gly Gly Ile Gly Lys Ile Gly Ser Glu Tyr Asn Gly Ala Val Tyr
    210                 215                 220

Phe Thr Pro Gln Ile Lys Asp Phe Ile Gln Lys His Ile Glu Gln
225                 230                 235
```

<210> 158
<211> 239
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 158

```
Met Asn Lys Asn Ile Val Ile Lys Ser Met Ala Ala Leu Ala Ile Leu
1               5                  10                  15

Thr Ser Val Thr Gly Ile Asn Ala Ala Val Val Glu Glu Thr Gln Gln
            20                  25                  30

Ile Ala Asn Ala Glu Lys Asn Val Thr Gln Val Lys Asp Thr Asn Asn
        35                  40                  45

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

Ile Gly Lys Asn Thr Ile Ile Thr Asn Lys His Val Ser Lys Asp Tyr
65                  70                  75                  80

Lys Val Gly Asp Arg Ile Thr Ala His Pro Asn Gly Asp Lys Gly Asn
                85                  90                  95

Gly Gly Ile Tyr Lys Ile Lys Ser Ile Ser Asp Tyr Pro Gly Asp Glu
            100                 105                 110

Asp Ile Ser Val Met Asn Ile Glu Glu Gln Ala Val Glu Arg Gly Pro
        115                 120                 125

Lys Gly Phe Asn Phe Asn Glu Asn Val Gln Ala Phe Asn Phe Ala Lys
    130                 135                 140

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

Ala Gln Asn Ser Phe Lys Gln Phe Glu Ser Thr Gly Thr Ile Lys Arg
                165                 170                 175

Ile Lys Asp Asn Ile Leu Asn Phe Asp Ala Tyr Ile Glu Pro Gly Asn
            180                 185                 190

Ser Gly Ser Pro Val Leu Asn Ser Asn Asn Glu Val Ile Gly Val Val
        195                 200                 205
```

Tyr Gly Gly Ile Gly Lys Ile Gly Ser Glu Tyr Asn Gly Ala Val Tyr
210 215 220

Phe Thr Pro Gln Ile Lys Asp Phe Ile Gln Lys His Ile Glu Gln
225 230 235

<210> 159
<211> 239
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 159

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

Thr Ser Val Thr Gly Ile Asn Ala Ala Val Val Glu Glu Thr Gln Gln
20 25 30

Ile Ala Asn Ala Glu Lys Asn Val Thr Gln Val Lys Asp Thr Asn Asn
35 40 45

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

Ile Gly Lys Asn Thr Ile Ile Thr Asn Lys His Val Ser Lys Asp Tyr
65 70 75 80

Lys Val Gly Asp Arg Ile Thr Ala His Pro Asn Gly Asp Lys Gly Asn
85 90 95

Gly Gly Ile Tyr Lys Ile Lys Ser Ile Ser Asp Tyr Pro Gly Asp Glu
100 105 110

Asp Ile Ser Val Met Asn Ile Glu Glu Gln Ala Val Glu Arg Gly Pro
115 120 125

Lys Gly Phe Asn Phe Asn Glu Asn Val Gln Ala Phe Asn Phe Ala Lys
130 135 140

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

```
Ala Gln Asn Ser Phe Lys Gln Phe Glu Ser Thr Gly Thr Ile Lys Arg
                165                 170                 175

Ile Lys Asp Asn Ile Leu Asn Phe Asp Ala Tyr Ile Glu Pro Gly Asn
            180                 185                 190

Ser Gly Ser Pro Val Leu Asn Ser Asn Asn Glu Val Ile Gly Val Val
        195                 200                 205

Tyr Gly Gly Ile Gly Lys Ile Gly Ser Glu Tyr Asn Gly Ala Val Tyr
    210                 215                 220

Phe Thr Pro Gln Ile Lys Asp Phe Ile Gln Lys His Ile Glu Gln
225                 230                 235
```

<210> 160
<211> 239
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 160

```
Met Asn Lys Asn Ile Val Ile Lys Ser Met Ala Ala Leu Ala Ile Leu
1               5                   10                  15

Thr Ser Val Thr Gly Ile Asn Ala Ala Val Val Glu Glu Thr Gln Gln
            20                  25                  30

Ile Ala Asn Ala Glu Lys Asn Val Thr Gln Val Lys Asp Thr Asn Asn
        35                  40                  45

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

Ile Gly Lys Asn Thr Ile Ile Thr Asn Lys His Val Ser Lys Asp Tyr
65                  70                  75                  80

Lys Val Gly Asp Arg Ile Thr Ala His Pro Asn Gly Asp Lys Gly Asn
                85                  90                  95

Gly Gly Ile Tyr Lys Ile Lys Ser Ile Ser Asp Tyr Pro Gly Asp Glu
```

```
            100                 105                 110

Asp Ile Ser Val Met Asn Ile Glu Glu Gln Ala Val Glu Arg Gly Pro
        115                 120                 125

Lys Gly Phe Asn Phe Asn Glu Asn Val Gln Ala Phe Asn Phe Ala Lys
    130                 135                 140

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

Ala Gln Asn Ser Phe Lys Gln Phe Glu Ser Thr Gly Thr Ile Lys Arg
                165                 170                 175

Ile Lys Asp Asn Ile Leu Asn Phe Asp Ala Tyr Ile Glu Pro Gly Asn
            180                 185                 190

Ser Gly Ser Pro Val Leu Asn Ser Asn Asn Glu Val Ile Gly Val Val
        195                 200                 205

Tyr Gly Gly Ile Gly Lys Ile Gly Ser Glu Tyr Asn Gly Ala Val Tyr
    210                 215                 220

Phe Thr Pro Gln Ile Lys Asp Phe Ile Gln Lys His Ile Glu Gln
225                 230                 235
```

<210> 161
<211> 239
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 161

```
Met Asn Lys Asn Ile Val Ile Lys Ser Met Ala Ala Leu Ala Ile Leu
1               5                   10                  15

Thr Ser Val Thr Gly Ile Asn Ala Ala Val Val Glu Glu Thr Gln Gln
            20                  25                  30

Ile Ala Asn Ala Glu Lys Asn Val Thr Gln Val Lys Asp Thr Asn Asn
        35                  40                  45
```

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

Ile Gly Lys Asn Thr Ile Ile Thr Asn Lys His Val Ser Lys Asp Tyr
65                  70                  75                  80

Lys Val Gly Asp Arg Ile Thr Ala His Pro Asn Gly Asp Lys Gly Asn
                85                  90                  95

Gly Gly Ile Tyr Lys Ile Lys Ser Ile Ser Asp Tyr Pro Gly Asp Glu
            100                 105                 110

Asp Ile Ser Val Met Asn Ile Glu Glu Gln Ala Val Glu Arg Gly Pro
        115                 120                 125

Lys Gly Phe Asn Phe Asn Glu Asn Val Gln Ala Phe Asn Phe Ala Lys
    130                 135                 140

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

Ala Gln Asn Ser Phe Lys Gln Phe Glu Ser Thr Gly Thr Ile Lys Arg
                165                 170                 175

Ile Lys Asp Asn Ile Leu Asn Phe Asp Ala Tyr Ile Glu Pro Gly Asn
            180                 185                 190

Ser Gly Ser Pro Val Leu Asn Ser Asn Asn Glu Val Ile Gly Val Val
        195                 200                 205

Tyr Gly Gly Ile Gly Lys Ile Gly Ser Glu Tyr Asn Gly Ala Val Tyr
    210                 215                 220

Phe Thr Pro Gln Ile Lys Asp Phe Ile Gln Lys His Ile Glu Gln
225                 230                 235
```

<210> 162
<211> 239
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 162

```
Met Asn Lys Asn Ile Val Ile Lys Ser Met Ala Ala Leu Ala Ile Leu
1               5                  10                  15

Thr Ser Val Thr Gly Ile Asn Ala Ala Val Val Glu Glu Thr Gln Gln
            20                  25                  30

Ile Ala Asn Ala Glu Lys Asn Val Thr Gln Val Lys Asp Thr Asn Asn
        35                  40                  45

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

Ile Gly Lys Asn Thr Ile Ile Thr Asn Lys His Val Ser Lys Asp Tyr
65                  70                  75                  80

Lys Val Gly Asp Arg Ile Thr Ala His Pro Asn Gly Asp Lys Gly Asn
                85                  90                  95

Gly Gly Ile Tyr Lys Ile Lys Ser Ile Ser Asp Tyr Pro Gly Asp Glu
            100                 105                 110

Asp Ile Ser Val Met Asn Ile Glu Glu Gln Ala Val Glu Arg Gly Pro
        115                 120                 125

Lys Gly Phe Asn Phe Asn Glu Asn Val Gln Ala Phe Asn Phe Ala Lys
    130                 135                 140

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

Ala Gln Asn Ser Phe Lys Gln Phe Glu Ser Thr Gly Thr Ile Lys Arg
                165                 170                 175

Ile Lys Asp Asn Ile Leu Asn Phe Asp Ala Tyr Ile Glu Pro Gly Asn
            180                 185                 190

Ser Gly Ser Pro Val Leu Asn Ser Asn Asn Glu Val Ile Gly Val Val
        195                 200                 205

Tyr Gly Gly Ile Gly Lys Ile Gly Ser Glu Tyr Asn Gly Ala Val Tyr
```

```
    210                 215                 220

Phe Thr Pro Gln Ile Lys Asp Phe Ile Gln Lys His Ile Glu Gln
225                 230                 235
```

<210> 163
<211> 239
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 163

```
Met Asn Lys Asn Ile Val Ile Lys Ser Met Ala Ala Leu Ala Ile Leu
1               5                   10                  15

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

Ile Ala Asn Ala Glu Lys Asn Val Thr Gln Val Lys Asp Thr Asn Val
        35                  40                  45

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

Ile Glu Lys Asn Thr Ile Ile Thr Asn Lys His Val Ser Lys Asp Tyr
65                  70                  75                  80

Lys Val Gly Asp Arg Ile Thr Ala His Pro Asn Gly Asp Lys Gly Asn
                85                  90                  95

Gly Gly Ile Tyr Lys Ile Lys Asn Ile Ser Asp Tyr Pro Gly Asn Glu
            100                 105                 110

Asp Ile Ser Val Met Asn Val Glu Glu Asn Ala Val Glu Arg Gly Ala
        115                 120                 125

Asn Gly Tyr Asn Phe Asn Glu Asn Val Gln Ala Phe Asn Phe Ala Lys
    130                 135                 140

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

```
Ala Gln Asn Thr Phe Lys Gln Phe Glu Ser Thr Gly Thr Val Lys Ser
                165                 170                 175

Ile Lys Asp Asn Asn Leu Asn Phe Asp Ala Tyr Ile Glu Pro Gly Asn
            180                 185                 190

Ser Gly Ser Pro Val Leu Asn Leu Asn Asn Glu Val Val Gly Val Val
        195                 200                 205

Tyr Gly Gly Ile Gly Lys Ile Gly Ser Glu Tyr Asn Gly Ala Val Tyr
    210                 215                 220

Phe Thr Pro Gln Ile Lys Glu Phe Ile Gln Lys His Ile Glu Gln
225                 230                 235
```

<210> 164
<211> 239
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

<220>
<221> característica_misc
<222> (19)..(19)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (28)..(28)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (48)..(48)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (64)..(64)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (66)..(66)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (91)..(91)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (104)..(104)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (111)..(111)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (119)..(119)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (122)..(122)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (128)..(129)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (131)..(131)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (140)..(140)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (164)..(164)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (174)..(174)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (176)..(176)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (181)..(181)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (200)..(200)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (205)..(205)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (231)..(231)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<400> 164

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

Thr Ser Xaa Thr Gly Ile Asn Ala Ala Val Val Xaa Glu Thr Gln Gln
20 25 30

Ile Ala Asn Ala Glu Lys Asn Val Thr Gln Val Lys Asp Thr Asn Xaa
35 40 45

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

Ile Xaa Lys Asn Thr Ile Ile Thr Asn Lys His Val Ser Lys Asp Tyr
65 70 75 80

Lys Val Gly Asp Arg Ile Thr Ala His Pro Xaa Gly Asp Lys Gly Asn
85 90 95

Gly Gly Ile Tyr Lys Ile Lys Xaa Ile Ser Asp Tyr Pro Gly Xaa Glu
100 105 110

Asp Ile Ser Val Met Asn Xaa Glu Glu Xaa Ala Val Glu Arg Gly Xaa
115 120 125

```
Xaa Gly Xaa Asn Phe Asn Glu Asn Val Gln Ala Xaa Asn Phe Ala Lys
    130                 135                 140

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

Ala Gln Asn Xaa Phe Lys Gln Phe Glu Ser Thr Gly Thr Xaa Lys Xaa
                165                 170                 175

Ile Lys Asp Asn Xaa Leu Asn Phe Asp Ala Tyr Ile Glu Pro Gly Asn
            180                 185                 190

Ser Gly Ser Pro Val Leu Asn Xaa Asn Asn Glu Val Xaa Gly Val Val
        195                 200                 205

Tyr Gly Gly Ile Gly Lys Ile Gly Ser Glu Tyr Asn Gly Ala Val Tyr
    210                 215                 220

Phe Thr Pro Gln Ile Lys Xaa Phe Ile Gln Lys His Ile Glu Gln
225                 230                 235
```

<210> 165
<211> 14
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 165

```
Pro Tyr Asn Gly Val Val Ser Phe Lys Asp Ala Thr Gly Phe
1               5                   10
```

<210> 166
<211> 14
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 166

```
Ala His Pro Asp Gly Asp Lys Gly Asn Gly Gly Ile Tyr Lys
1               5                   10
```

<210> 167
<211> 14
<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 167

Ala His Pro Asn Gly Asp Lys Gly Asn Gly Gly Ile Tyr Lys
1 5 10

<210> 168
<211> 14
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

<220>
<221> característica_misc
<222> (4)..(4)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<400> 168

Ala His Pro Xaa Gly Asp Lys Gly Asn Gly Gly Ile Tyr Lys
1 5 10

<210> 169
<211> 14
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 169

Ser Ile Ser Asp Tyr Pro Gly Asp Glu Asp Ile Ser Val Met
1 5 10

<210> 170
<211> 14
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 170

Asn Ile Ser Asp Tyr Pro Gly Asn Glu Asp Ile Ser Val Met
1 5 10

<210> 171
<211> 14
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

<220>
<221> característica_misc
<222> (1)..(1)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (8)..(8)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<400> 171

Xaa Ile Ser Asp Tyr Pro Gly Xaa Glu Asp Ile Ser Val Met
1 5 10

<210> 172
<211> 14
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 172

Arg Gly Pro Lys Gly Phe Asn Phe Asn Glu Asn Val Gln Ala
1 5 10

<210> 173
<211> 14
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 173

Arg Gly Ala Asn Gly Tyr Asn Phe Asn Glu Asn Val Gln Ala
1 5 10

<210> 174
<211> 14
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

<220>
<221> característica_misc

<222> (3)..(4)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (6)..(6)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<400> 174

Arg Gly Xaa Xaa Gly Xaa Asn Phe Asn Glu Asn Val Gln Ala
1 5 10

<210> 175
<211> 14
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 175

Gln Phe Glu Ser Thr Gly Thr Ile Lys Arg Ile Lys Asp Asn
1 5 10

<210> 176
<211> 14
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 176

Gln Phe Glu Ser Thr Gly Thr Val Lys Ser Ile Lys Asp Asn
1 5 10

<210> 177
<211> 14
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

<220>
<221> característica_misc
<222> (8)..(8)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<220>
<221> característica_misc
<222> (10)..(10)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<400> 177

Gln Phe Glu Ser Thr Gly Thr Xaa Lys Xaa Ile Lys Asp Asn
1 5 10

<210> 178
<211> 14
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 178

Gly Asn Ser Gly Ser Pro Val Leu Asn Ser Asn Asn Glu Val
1 5 10

<210> 179
<211> 14
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 179

Gly Asn Ser Gly Ser Pro Val Leu Asn Leu Asn Asn Glu Val
1 5 10

<210> 180
<211> 14
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

<220>
<221> característica_misc
<222> (10)..(10)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de presentación natural

<400> 180

Gly Asn Ser Gly Ser Pro Val Leu Asn Xaa Asn Asn Glu Val
1 5 10

<210> 181
<211> 975
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 181
atgaaatttg atagacatag aagattgaga tcatcagcga caatgagaga tatggttaga
60

gagaatcatg taagaaaaga agatttaata tatccaattt ttgtagttga aaaagacgat
120

gtgaaaaaag aaattaagtc attgccaggt gtataccaaa tcagtttgaa tttacttgaa
180

agtgaattaa aagaagctta tgacttaggc atacgtgcca ttatgttttt cggtgttcca
240

aactcaaaag atgatatagg tactggtgca tacattcacg atggtgttat tcaacaggca
300

acacgtattg ctaaaaaaat gtatgatgac ttattaattg ttgcagacac ttgtttatgt
360

gaatatactg atcatggtca ttgtggcgtg attgatgacc atacacatga cgttgacaat
420

gataaatcat tgccactact tgttaaaaca gcaatttctc aagtggaagc tggtgctgat
480

attattgcgc caagtaatat gatggatggt tttgttgctg aaattcgtcg tggattagat
540

gaagccggct attacaatat tcctataatg agttatggtg tcaagtatgc atcaagtttc
600

tttggacctt ttagagatgc agcagattca gcgccatcat ttggggatag aaaaacgtat
660

cagatggacc ctgctaaccg tttggaagca cttcgtgaat tagaaagtga tcttaaagaa
720

gggtgcgaca tgatgattgt taaacctgct ctaagttatt tagatatagt tcgagatgtt
780

aaaaatcata cgaatgttcc agttgttgca tataatgtga gtggagaata tagtatgact
840

aaagcagcgg cacaaaatgg ttggatagat gaagaacgtg tcgttatgga acaaatggtt
900

tcaatgaaac gtgcaggtgc tgatatgatt attacgtatt ttgcaaagga catttgtcgc
960

tatttagata aataa
975

<210> 182

<211> 324
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 182

```
Met Lys Phe Asp Arg His Arg Arg Leu Arg Ser Ser Ala Thr Met Arg
1               5                  10                  15

Asp Met Val Arg Glu Asn His Val Arg Lys Glu Asp Leu Ile Tyr Pro
            20                  25                  30

Ile Phe Val Val Glu Lys Asp Asp Val Lys Lys Glu Ile Lys Ser Leu
        35                  40                  45

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

Glu Ala Tyr Asp Leu Gly Ile Arg Ala Ile Met Phe Phe Gly Val Pro
65                  70                  75                  80

Asn Ser Lys Asp Asp Ile Gly Thr Gly Ala Tyr Ile His Asp Gly Val
                85                  90                  95

Ile Gln Gln Ala Thr Arg Ile Ala Lys Lys Met Tyr Asp Asp Leu Leu
            100                 105                 110

Ile Val Ala Asp Thr Cys Leu Cys Glu Tyr Thr Asp His Gly His Cys
        115                 120                 125

Gly Val Ile Asp Asp His Thr His Asp Val Asp Asn Asp Lys Ser Leu
    130                 135                 140

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

Ile Ile Ala Pro Ser Asn Met Met Asp Gly Phe Val Ala Glu Ile Arg
                165                 170                 175

Arg Gly Leu Asp Glu Ala Gly Tyr Tyr Asn Ile Pro Ile Met Ser Tyr
            180                 185                 190
```

```
Gly Val Lys Tyr Ala Ser Ser Phe Phe Gly Pro Phe Arg Asp Ala Ala
        195                 200                 205

Asp Ser Ala Pro Ser Phe Gly Asp Arg Lys Thr Tyr Gln Met Asp Pro
    210                 215                 220

Ala Asn Arg Leu Glu Ala Leu Arg Glu Leu Glu Ser Asp Leu Lys Glu
225                 230                 235                 240

Gly Cys Asp Met Met Ile Val Lys Pro Ala Leu Ser Tyr Leu Asp Ile
                245                 250                 255

Val Arg Asp Val Lys Asn His Thr Asn Val Pro Val Val Ala Tyr Asn
            260                 265                 270

Val Ser Gly Glu Tyr Ser Met Thr Lys Ala Ala Ala Gln Asn Gly Trp
        275                 280                 285

Ile Asp Glu Glu Arg Val Val Met Glu Gln Met Val Ser Met Lys Arg
    290                 295                 300

Ala Gly Ala Asp Met Ile Ile Thr Tyr Phe Ala Lys Asp Ile Cys Arg
305                 310                 315                 320

Tyr Leu Asp Lys
```

<210> 183
<211> 2802
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 183
atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca
60

gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt
120

gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt
180

agcgttagtg ctgcacctaa aacagacgac acaaacgtga gtgatactaa aacatcgtca
240

aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa
300

tcatcatcaa caaatgcaac tacggaagaa acgccggtaa ctggtgaagc tactactacg
360

acaacgaatc aagctaatac accggcaaca actcaatcaa gcaatacaaa tgcggaggaa
420

ttagtgaatc aaacaagtaa tgaaacgact tttaatgata ctaatacagt atcatctgta
480

aattcacctc aaaattctac aaatgcggaa aatgtttcaa caacgcaaga tacttcaact
540

gaagcaacac cttcaaacaa tgaatcagct ccacagagta cagatgcaag taataaagat
600

gtagttaatc aagcggttaa tacaagtgcg cctagaatga gagcatttag tttagcggca
660

gtagctgcag atgcaccggc agctggcaca gatattacga atcagttgac gaatgtgaca
720

gttggtattg actctggtac gactgtgtat ccgcaccaag caggttatgt caaactgaat
780

tatggttttt cagtgcctaa ttctgctgtt aaaggtgaca cattcaaaat aactgtacct
840

aaagaattaa acttaaatgg tgtaacttca actgctaaag tgccaccaat tatggctgga
900

gatcaagtat tggcaaatgg tgtaatcgat agtgatggta atgttattta tacatttaca
960

gactatgtaa atactaaaga tgatgtaaaa gcaactttga ccatgcccgc ttatattgac
1020

cctgaaaatg ttaaaaagac aggtaatgtg acattggcta ctggcatagg tagtacaaca
1080

gcaaacaaaa cagtattagt agattatgaa aaatatggta agttttataa cttatctatt
1140

aaaggtacaa ttgaccaaat cgataaaaca aataatacgt atcgtcagac aatttatgtc
1200

aatccaagtg gagataacgt tattgcgccg gttttaacag gtaatttaaa accaaatacg
1260

gatagtaatg cattaataga tcagcaaaat acaagtatta aagtatataa agtagataat
1320

gcagctgatt tatctgaaag ttactttgtg aatccagaaa actttgagga tgtcactaat
1380

agtgtgaata ttacattccc aaatccaaat caatataaag tagagtttaa tacgcctgat
1440

gatcaaatta caacaccgta tatagtagtt gttaatggtc atattgatcc gaatagcaaa
1500

ggtgatttag ctttacgttc aactttatat gggtataact cgaatataat ttggcgctct
1560

atgtcatggg acaacgaagt agcatttaat aacggatcag gttctggtga cggtatcgat
1620

aaaccagttg ttcctgaaca acctgatgag cctggtgaaa ttgaaccaat tccagaggat
1680

tcagattctg acccaggttc agattctggc agcgattcta attcagatag cggttcagat
1740

tcgggtagtg attctacatc agatagtggt tcagattcag cgagtgattc agattcagca
1800

agtgattcag actcagcgag tgattcagat tcagcaagcg attccgactc agcgagcgat
1860

tccgactcag acaatgactc ggattcagat agcgattctg actcagacag tgactcagat
1920

tccgacagtg actcagattc agatagcgat tctgactcag acagtgactc agattcagat
1980

agcgattcag attcagatag cgattcagat tccgacagtg attccgactc agacagcgat
2040

tctgactccg acagtgattc cgactcagac agcgattcag attccgacag tgattccgac
2100

tcagatagcg attccgactc agatagcgac tcagattcag acagcgattc agattcagac
2160

agcgattcag attcagatag cgattcagat tccgacagtg actcagattc cgacagtgac
2220

tcggattcag atagcgattc agattccgac agtgactcag attccgacag tgactcagac
2280

tcagacagtg attcggattc agcgagtgat tcggattcag atagtgattc cgactccgac
2340

agtgactcgg attcagatag cgactcagac tcggatagcg actcggattc agatagcgat
2400

tcggactcag atagcgattc agaatcagac agcgattcag aatcagacag cgattcagat
2460

tcagacagcg actcagacag tgactcagat tcagatagtg actcggattc agcgagtgat
2520

tcagactcag gtagtgactc cgattcatca agtgattccg actcagaaag tgattcaaat
2580

agcgattccg agtcaggttc taacaataat gtagttccgc ctaattcacc taaaaatggt
2640

actaatgctt ctaataaaaa tgaggctaaa gatagtaaag aaccattacc agatacaggt
2700

tctgaagatg aagcaaatac gtcactaatt tggggattat tagcatcaat aggttcatta
2760

ctacttttca gaagaaaaaa agaaaataaa gataagaaat aa
2802

<210> 184
<211> 933
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 184

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

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

Ser Ser Lys Glu Ala Asp Ala Ser Glu Asn Ser Val Thr Gln Ser Asp
35 40 45

Ser Ala Ser Asn Glu Ser Lys Ser Asn Asp Ser Ser Ser Val Ser Ala
50 55 60

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

Asn Thr Asn Asn Gly Glu Thr Ser Val Ala Gln Asn Pro Ala Gln Gln
85 90 95

Glu Thr Thr Gln Ser Ser Ser Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro

```
            100                 105                 110

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

Ala Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln
    130                 135                 140

Thr Ser Asn Glu Thr Thr Phe Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val
145                 150                 155                 160

Asn Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln
                165                 170                 175

Asp Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln
            180                 185                 190

Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr
        195                 200                 205

Ser Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp
    210                 215                 220

Ala Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asn Val Thr
225                 230                 235                 240

Val Gly Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr
                245                 250                 255

Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly
            260                 265                 270

Asp Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val
        275                 280                 285

Thr Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu
    290                 295                 300

Ala Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr
305                 310                 315                 320
```

```
Asp Tyr Val Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Met Pro
                325                 330                 335

Ala Tyr Ile Asp Pro Glu Asn Val Lys Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu
            340                 345                 350

Ala Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp
        355                 360                 365

Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile
    370                 375                 380

Asp Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val
385                 390                 395                 400

Asn Pro Ser Gly Asp Asn Val Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu
                405                 410                 415

Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser
            420                 425                 430

Ile Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser Tyr
        435                 440                 445

Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile
    450                 455                 460

Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro Asp
465                 470                 475                 480

Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp
                485                 490                 495

Pro Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr
            500                 505                 510

Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala
        515                 520                 525

Phe Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val
```

530 535 540

Pro Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu Asp
545 550 555 560

Ser Asp Ser Asp Pro Gly Ser Asp Ser Gly Ser Asp Ser Asn Ser Asp
565 570 575

Ser Gly Ser Asp Ser Gly Ser Asp Ser Thr Ser Asp Ser Gly Ser Asp
580 585 590

Ser Ala Ser Asp Ser Asp Ser Ala Ser Asp Ser Asp Ser Ala Ser Asp
595 600 605

Ser Asp Ser Ala Ser Asp Ser Asp Ser Ala Ser Asp Ser Asp Ser Asp
610 615 620

Asn Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp
625 630 635 640

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

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

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

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

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

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

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

```
Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Ala
        755                 760                 765

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

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

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

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

Ser Asp Ser Asp Ser Ala Ser Asp Ser Asp Ser Gly Ser Asp Ser Asp
        835                 840                 845

Ser Ser Ser Asp Ser Asp Ser Glu Ser Asp Ser Asn Ser Asp Ser Glu
    850                 855                 860

Ser Gly Ser Asn Asn Asn Val Val Pro Pro Asn Ser Pro Lys Asn Gly
865                 870                 875                 880

Thr Asn Ala Ser Asn Lys Asn Glu Ala Lys Asp Ser Lys Glu Pro Leu
                885                 890                 895

Pro Asp Thr Gly Ser Glu Asp Glu Ala Asn Thr Ser Leu Ile Trp Gly
            900                 905                 910

Leu Leu Ala Ser Ile Gly Ser Leu Leu Leu Phe Arg Arg Lys Lys Glu
        915                 920                 925

Asn Lys Asp Lys Lys
    930
```

<210> 185
<211> 219
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 185

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

Phe Asn His Leu Thr Met Ser Phe Asp Ser Asn Arg Leu Thr Val Leu
            20                  25                  30

Leu Gly Asp Asn Gly Ala Gly Lys Ser Thr Leu Leu Arg Met Ile Ala
        35                  40                  45

Gly Ile Glu Lys Ala Asn Asp Gly Thr Ile Asn Tyr Phe Gly Glu Lys
    50                  55                  60

Trp Asn Gln Arg Gln Ile Gln Asn His Ile Gly Tyr Val Pro Gln Asp
65                  70                  75                  80

Ile Ala Leu Phe Glu His Met Thr Val Ala Glu Asn Ile Lys Phe Phe
                85                  90                  95

Lys Ser Leu Cys Lys Asn Pro Ile Asn Asp Thr Thr Ile Asn Glu Tyr
            100                 105                 110

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

Ser Gly Gly Asn Lys Arg Lys Ile Asn Ile Leu Val Gly Leu Leu Gly
    130                 135                 140

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

Lys Ser Arg His Asp Ile His Gln Leu Leu Asn Ile Met Lys Ser Lys
                165                 170                 175

Cys Leu Ile Ile Leu Thr Thr His His Leu Asp Glu Val Glu Ala Leu
            180                 185                 190

Ala Asp Asp Ile Lys Leu Ile Gly Gln Asp Pro Phe Tyr Gln His Val
        195                 200                 205
```

Leu Glu Asp Lys Gln Trp Thr Tyr Thr Tyr Tyr
210 215

<210> 186
<211> 253
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 186

Met Ala Ile Leu Glu Val Lys Gln Leu Thr Lys Ile Tyr Gly Thr Lys
1 5 10 15

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

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

Leu Leu Asn Val Leu Ser Ser Ile Asp Tyr Ile Ser Gln Gly Ser Ile
50 55 60

Thr Leu Lys Gly Lys Lys Leu Glu Lys Leu Ser Asn Lys Glu Leu Ser
65 70 75 80

Asp Ile Arg Lys His Asp Ile Gly Phe Ile Phe Gln Glu Tyr Asn Leu
85 90 95

Leu His Thr Leu Thr Val Lys Glu Asn Ile Met Leu Pro Leu Thr Val
100 105 110

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

Glu Ala Leu Asn Ile Leu Asp Ile Ser Asp Lys Tyr Pro Ser Glu Leu
130 135 140

Ser Gly Gly Gln Arg Gln Arg Thr Ser Ala Ala Arg Ala Phe Ile Thr
145 150 155 160

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

```
Lys Ser Thr Gln Asp Leu Leu Lys Arg Leu Thr Arg Met Asn Glu Ala
            180                 185                 190

Phe Lys Ser Thr Ile Ile Met Val Thr His Asp Pro Val Ala Ala Ser
        195                 200                 205

Tyr Ala Asn Arg Val Val Met Leu Lys Asp Gly Gln Ile Phe Thr Glu
    210                 215                 220

Leu Tyr Gln Gly Asp Asp Asp Lys His Thr Phe Phe Lys Glu Ile Ile
225                 230                 235                 240

Arg Val Gln Ser Val Leu Gly Gly Val Asn Tyr Asp Leu
                245                 250
```

<210> 187
<211> 243
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 187

```
Met Ile Leu Ser Tyr Leu Lys Ile Glu Phe Lys Val Ile Met Arg Lys
1               5                   10                  15

Lys Thr Thr Leu Ile Leu Ser Ile Leu Phe Pro Val Ile Phe Tyr Ile
            20                  25                  30

Leu Phe Thr Ser Ile Leu Glu Leu Pro Glu Asp Val Lys Pro Lys Phe
        35                  40                  45

Tyr Lys Glu Tyr Met Tyr Ser Met Thr Val Tyr Ser Leu Leu Ser Phe
    50                  55                  60

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

Trp Arg Gln Arg Leu Met Val Thr Pro Phe Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr
                85                  90                  95

Ile Ser Lys Val Val Lys Thr Met Leu Gln Phe Ala Ile Ala Ile Leu
            100                 105                 110
```

```
Val Ile Phe Met Val Gly His Phe Tyr Lys Gly Val Ala Met Ser Ala
        115                 120                 125

Val Gln Trp Leu Glu Ser Gly Ile Phe Leu Trp Leu Gly Ala Ser Leu
    130                 135                 140

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

Thr Ser Ala Leu Ala Asn Ile Val Thr Ile Gly Leu Ala Val Leu Gly
                165                 170                 175

Gly Leu Trp Phe Pro Ile Asn Thr Phe Pro Asn Trp Leu Gln His Val
            180                 185                 190

Ala His Val Leu Pro Ser Tyr His Leu Arg Lys Leu Gly Val Asp Ile
        195                 200                 205

Ala Ser Asn His His Ile Asn Leu Ile Ser Phe Ala Ile Ile Leu Leu
    210                 215                 220

Tyr Ala Leu Gly Ser Ile Ile Ala Val Tyr Cys Ile Ser His Phe Lys
225                 230                 235                 240

Arg Ala Glu
```

<210> 188
<211> 276
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 188

```
Met His Lys Ile Phe Ser Lys Asn Asn Leu Ile Phe Phe Val Phe Val
1               5                   10                  15

Ala Phe Ile Phe Val Val Ile Val Leu Gln Phe Phe Val Ser Ser Glu
            20                  25                  30

Asn Ala Thr Lys Val Asn Leu Ser Gln Thr Phe Glu Pro Ile Ser Trp
```

```
        35                  40                  45

Leu His Leu Leu Gly Thr Asp Asp Tyr Gly Arg Asp Leu Phe Thr Arg
    50                  55                  60

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

Ile Ala Ile Val Val Ile Gly Val Thr Leu Gly Leu Phe Ala Gly Tyr
                85                  90                  95

Lys Lys Gly Trp Ile Glu Arg Leu Val Leu Arg Phe Ile Asp Val Gly
            100                 105                 110

Leu Ser Ile Pro Glu Phe Ile Ile Met Ile Ala Leu Ala Ser Phe Phe
        115                 120                 125

Gln Pro Ser Leu Trp Asn Leu Val Ile Ser Ile Thr Leu Ile Lys Trp
    130                 135                 140

Met Asn Tyr Thr Arg Leu Thr Arg Ser Ile Val Asn Ser Glu Met Asn
145                 150                 155                 160

Lys Pro Tyr Ile Lys Met Ala Gln Leu Phe His Val Pro Thr Arg Thr
                165                 170                 175

Ile Leu Ile Arg His Leu Thr Pro Lys Ile Ile Pro Ala Ile Ile Val
            180                 185                 190

Leu Met Val Val Asp Phe Gly Lys Ile Ile Leu Tyr Ile Ser Ser Leu
        195                 200                 205

Ser Phe Ile Gly Leu Gly Ala Gln Pro Pro Thr Pro Glu Trp Gly Ala
    210                 215                 220

Met Leu Gln Gln Gly Arg Asp Phe Ile Ser Ser His Pro Ile Met Leu
225                 230                 235                 240

Ile Ala Pro Ala Ser Val Ile Ala Ile Thr Ile Leu Ile Phe Asn Leu
                245                 250                 255
```

```
Thr Gly Asp Ala Leu Arg Asp Arg Leu Leu Lys Gln Arg Gly Glu Tyr
            260                 265                 270

Asp Glu Ser His
        275
```

<210> 189
<211> 136
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 189

```
Met Asn Thr Asn Asp Ala Ile Lys Ile Leu Lys Glu Asn Gly Leu Lys
1               5                   10                  15

Tyr Thr Asp Lys Arg Lys Asp Met Leu Asp Ile Phe Val Glu Glu Asp
            20                  25                  30

Lys Tyr Ile Asn Ala Lys Tyr Ile Gln Gln Val Met Asp Glu Asn Tyr
        35                  40                  45

Pro Gly Ile Ser Phe Asp Thr Ile Tyr Arg Asn Leu His Leu Phe Lys
    50                  55                  60

Asp Leu Gly Ile Ile Glu Asn Thr Glu Leu Asp Gly Glu Met Lys Phe
65                  70                  75                  80

Arg Ile Ala Cys Thr Asn His His His His His Phe Ile Cys Glu Lys
                85                  90                  95

Cys Gly Asp Thr Lys Val Ile Asp Tyr Cys Pro Ile Asp Gln Ile Lys
            100                 105                 110

Leu Ser Leu Pro Gly Val Asn Ile His Lys His Lys Leu Glu Val Tyr
        115                 120                 125

Gly Val Cys Glu Ser Cys Gln Asp
    130                 135
```

<210> 190
<211> 233

<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 190

```
Met Thr His Lys Tyr Ile Ser Thr Gln Met Leu Ile Ile Phe Thr Ala
1               5                  10                  15

Leu Met Ile Ile Ala Asn Phe Tyr Tyr Ile Phe Phe Glu Lys Ile Gly
            20                  25                  30

Phe Leu Leu Val Leu Leu Leu Gly Cys Val Leu Val Tyr Val Gly Tyr
        35                  40                  45

Leu Tyr Phe His Lys Ile Arg Gly Leu Leu Ala Phe Trp Ile Gly Ala
    50                  55                  60

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

Leu Phe Val Phe Leu Leu Leu Leu Ile Val Arg Tyr Leu Ile His Lys
                85                  90                  95

Phe Lys Pro Lys Lys Val Val Ala Thr Asp Glu Val Met Thr Ser Pro
            100                 105                 110

Ser Phe Ile Lys Gln Lys Trp Phe Gly Glu Gln Arg Thr Pro Val Tyr
        115                 120                 125

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

His Ile Asp Leu Thr Lys Ala Ala Asn Ile Lys Glu Asn Asn Thr Ile
145                 150                 155                 160

Val Val Arg His Ile Leu Gly Lys Val Gln Val Ile Leu Pro Val Asn
                165                 170                 175

Tyr Asn Ile Asn Leu His Val Ala Ala Phe Tyr Gly Ser Thr Tyr Val
            180                 185                 190

Asn Glu Lys Ser Tyr Lys Val Glu Asn Asn Asn Ile His Ile Glu Glu
```

195 200 205

Met Met Lys Pro Asp Asn Tyr Thr Val Asn Ile Tyr Val Ser Thr Phe
210 215 220

Ile Gly Asp Val Glu Val Ile Tyr Arg
225 230

<210> 191
<211> 260
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 191

Met Leu Ile Gln Leu Asp Gln Ile Gly Arg Met Lys Gln Gly Lys Thr
1 5 10 15

Ile Leu Lys Lys Ile Ser Trp Gln Ile Ala Lys Gly Asp Lys Trp Ile
20 25 30

Leu Tyr Gly Leu Asn Gly Ala Gly Lys Thr Thr Leu Leu Asn Ile Leu
35 40 45

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

Met Pro Gly Lys Val Gly Tyr Ser Ala Glu Thr Val Arg Gln His Ile
65 70 75 80

Gly Phe Val Ser His Ser Leu Leu Glu Lys Phe Gln Glu Gly Glu Arg
85 90 95

Val Ile Asp Val Val Ile Ser Gly Ala Phe Lys Ser Ile Gly Val Tyr
100 105 110

Gln Asp Ile Asp Asp Glu Ile Arg Asn Glu Ala His Gln Leu Leu Lys
115 120 125

Leu Val Gly Met Ser Ala Lys Ala Gln Gln Tyr Ile Gly Tyr Leu Ser
130 135 140

```
Thr Gly Glu Lys Gln Arg Val Met Ile Ala Arg Ala Leu Met Gly Gln
145                 150                 155                 160

Pro Gln Val Leu Ile Leu Asp Glu Pro Ala Ala Gly Leu Asp Phe Ile
                165                 170                 175

Ala Arg Glu Ser Leu Leu Ser Ile Leu Asp Ser Leu Ser Asp Ser Tyr
            180                 185                 190

Pro Thr Leu Ala Met Ile Tyr Val Thr His Phe Ile Glu Glu Ile Thr
        195                 200                 205

Ala Asn Phe Ser Lys Ile Leu Leu Leu Lys Asp Gly Gln Ser Ile Gln
    210                 215                 220

Gln Gly Ala Val Glu Asp Ile Leu Thr Ser Glu Asn Met Ser Arg Phe
225                 230                 235                 240

Phe Gln Lys Asn Val Ala Val Gln Arg Trp Asn Asn Arg Phe Ser Met
                245                 250                 255

Ala Met Leu Glu
            260
```

<210> 192
<211> 209
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 192

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

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

Asp Asp Lys Ala Lys Thr Glu Gln Gln Asp Lys Lys Thr Asn Asp Ser
        35                  40                  45

Ser Lys Asp Lys Lys Asp Asn Lys Asp Asp Ser Lys Asp Val Asn Lys
    50                  55                  60
```

```
Asp Asn Lys Asp Asn Ser Ala Asn Asp Asn Gln Gln Gln Ser Asn Ser
65                  70                  75                  80

Asn Ala Thr Asn Asn Asp Gln Asn Gln Thr Asn Asn Asn Gln Ser Ser
                85                  90                  95

Asn Asn Gln Ala Asn Asn Asn Gln Lys Ser Ser Tyr Val Ala Pro Tyr
            100                 105                 110

Tyr Gly Gln Asn Ala Ala Pro Val Ala Arg Gln Ile Tyr Pro Phe Asn
        115                 120                 125

Gly Asn Lys Asn Gln Ala Leu Gln Gln Leu Pro Asn Phe Gln Thr Ala
    130                 135                 140

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

Val Tyr Asn Asp Tyr Ser Ile Glu Glu His Asn Gly Asn Tyr Lys Tyr
                165                 170                 175

Val Phe Ser Phe Lys Asp Pro Asn Ala Asn Gly Lys Tyr Ser Ile Val
            180                 185                 190

Thr Val Asp Tyr Thr Gly Gln Ala Met Val Thr Asp Pro Asn Tyr Gln
        195                 200                 205

Gln
```

<210> 193
<211> 439
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 193

```
Met Arg Thr Gly His Tyr Thr Pro Ile Pro Asn Glu Pro His Tyr Leu
1               5                   10                  15

Val Ile Ser His Ala Asp Lys Leu Thr Ala Thr Glu Lys Ala Lys Leu
            20                  25                  30
```

```
Arg Leu Leu Ile Ile Lys Gln Lys Leu Asp Ile Ser Leu Ala Glu Ser
        35                  40                  45

Val Val Ser Ser Pro Ile Ala Ser Glu His Val Ile Glu Gln Leu Thr
    50                  55                  60

Leu Phe Gln His Glu Arg Arg His Leu Arg Pro Lys Ile Ser Ala Thr
65                  70                  75                  80

Phe Leu Ala Trp Leu Leu Ile Phe Leu Met Phe Ala Leu Pro Ile Gly
                85                  90                  95

Ile Ala Tyr Gln Phe Ser Asp Trp Phe Gln Asn Gln Tyr Val Ser Ala
            100                 105                 110

Trp Ile Glu Tyr Leu Thr Gln Thr Thr Leu Leu Asn His Asp Ile Leu
        115                 120                 125

Gln His Ile Leu Phe Gly Asp Tyr Gly Val Leu Ser Leu Gly Thr Tyr
    130                 135                 140

Ser Leu Val Trp Ala Leu Pro Val Val Ile Leu Ile Ser Leu Ser Thr
145                 150                 155                 160

Ala Ile Ile Asp Gln Thr Gly Leu Lys Ser Trp Met Ile Trp Ala Ile
                165                 170                 175

Glu Pro Ser Met Leu Trp Ile Gly Leu Gln Gly Asn Asp Ile Val Pro
            180                 185                 190

Leu Leu Glu Gly Phe Gly Cys Asn Ala Ala Ala Ile Ser Gln Ala Ala
        195                 200                 205

His Gln Cys His Thr Cys Thr Lys Thr Gln Cys Met Ser Leu Ile Ser
    210                 215                 220

Phe Gly Ser Ser Cys Ser Tyr Gln Ile Gly Ala Thr Leu Ser Ile Phe
225                 230                 235                 240
```

```
Ser Val Ala Gly Lys Ser Trp Leu Phe Met Pro Tyr Leu Ile Leu Val
                245                 250                 255

Leu Leu Gly Gly Ile Leu His Asn Arg Ile Trp Leu Lys Lys Asn Asp
            260                 265                 270

Gln Gln Leu Ser Val Pro Leu Pro Tyr Asp Arg Gln Leu His Met Pro
        275                 280                 285

Asn Ile Arg Gln Met Leu Leu Gln Met Trp Gln Asn Ile Gln Met Phe
    290                 295                 300

Ile Val Gln Ala Leu Pro Ile Phe Ile Thr Ile Cys Leu Ile Val Ser
305                 310                 315                 320

Ile Leu Ser Leu Thr Pro Ile Leu Asn Val Leu Ser Gln Ile Phe Thr
                325                 330                 335

Pro Ile Leu Ser Leu Leu Gly Ile Ser Ser Glu Leu Ser Pro Gly Ile
            340                 345                 350

Leu Phe Ser Met Ile Arg Lys Asp Gly Met Leu Leu Phe Asn Leu His
        355                 360                 365

Gln Gly Ala Leu Leu Gln Gly Met Thr Ala Thr Gln Leu Leu Leu Leu
    370                 375                 380

Val Phe Phe Ser Ser Thr Phe Thr Ala Cys Ser Val Thr Met Thr Met
385                 390                 395                 400

Leu Leu Lys His Leu Gly Gly Gln Ser Ala Leu Lys Leu Ile Gly Lys
                405                 410                 415

Gln Met Val Thr Ser Leu Ser Leu Val Ile Gly Val Gly Ile Ile Val
            420                 425                 430

Lys Ile Val Met Leu Ile Ile
        435
```

<210> 194
<211> 22

<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

<400> 194
tcgtcgttgt cgttttgtcg tt
22

<210> 195
<211> 13
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

<400> 195

Ile Leu Pro Trp Lys Trp Pro Trp Trp Pro Trp Arg Arg
1 5 10

<210> 196
<211> 13
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

<400> 196

Lys Asp Tyr Glu Arg Lys Tyr Lys Lys His Ile Val Ser
1 5 10

MEMORIA DESCRIPTIVA

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] N.A.

DECLARACIÓN REFERENTE A INVESTIGACIÓN O DESARROLLO PATROCINADO POR EL GOBIERNO FEDERAL

[0002] N.A.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0003] La presente invención se refiere a constructos de vacuna y sus usos contra infecciones causadas por *Staphylococcus*. Más específicamente, la presente invención se refiere a constructos de vacuna que combinan antígenos y sus usos contra infecciones causadas por *Staphylococcus* tales como infecciones intramamarias (IIM) en bovinos.

REFERENCIA A LISTADO DE SECUENCIAS

[0004] De acuerdo con 37 C.F.R. 1.821(c), se presenta conjuntamente con la presente invención un listado de secuencias como un archivo de texto ASCII compatible denominado LISTADO DE SECUENCIAS USP62411120_ST25, creado el 5 de octubre, 2017 y que tiene un tamaño de 278 kilobytes. El contenido del archivo antes mencionado queda incorporado a la presente a modo de referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0005] Las mastitis bovina es la enfermedad más frecuente y costosa para los productores de leche y se considera que *Staphylococcus aureus* es la bacteria transmisible que es con mayor frecuencia responsable del desarrollo de la enfermedad (Sears *et al.*, 2003). Las IIM causadas por estafilococos, las cuales pueden desencadenar en una mastitis, son difíciles de tratar y las recaídas frecuentes son comunes (Sandholm *et al*., 1990).

[0006] El desarrollo de vacunas para la prevención y control de las IIM causadas por *S. aureus* ha sido investigado extensamente si bien ninguna formulación ha demostrado una eficacia protectora hasta la fecha. Esto se debe probablemente a los objetivos inadecuados de vacuna (Middleton, 2008; Middleton 2009), la elevada diversidad entre las cepas capaces de provocar mastitis (Buzzola, 2007; Kerro-Dego, 2006; Middleton, 2008) o la imposibilidad de producir una respuesta inmune apropiada (Bharathan, 2011; Ferens, 2000; Fowler, 2014; Proctor, 2012). Se entiende cada vez más que la inmunidad

solamente basada en los anticuerpos inducidos por vacunas puede ser importante aunque es sin embargo insuficiente para inducir protección contra *S. aureus* (Middleton 2008; Middleton 2009). Parece ser que la inmunidad mediada por células (IMC) basada en respuestas tipo Th1 y Th17 puede ser necesaria para completar la protección (Fowler, 2014; Lin, 2009; Proctor, 2012; Spellberg, 2012).

[0007] La susceptibilidad bacteriana a los antibióticos *in vitro* es un pobre pronosticador de la eficacia terapéutica en vacas crónicamente infectadas (Owens *et al*., 1997). Si bien las infecciones que surgen luego del tratamiento de la mastitis pueden deberse a cepas recientemente adquiridas, a menudo son el resultado de la persistencia del organismo infeccioso original (Sandholm *et al*., 1990; Myllys *et al*., 1997). Por lo tanto, las terapias existentes a menudo no pueden eliminar la infección y sería sumamente conveniente encontrar nuevos métodos para prevenir o tratar las IIM estafilocócicas.

[0008] Se ha observado una falta de eficacia de las vacunas y capacidad protectora para las vacunas contra *S. aureus* comercialmente disponibles (Middleton, 2008). Por lo tanto, sería sumamente conveniente utilizar antígenos de *S. aureus* altamente eficaces que se sabe que son expresados durante IIM como componentes de la vacuna para la protección contra la IIM y la mastitis.

[0009] La presente invención busca cubrir estas y otras necesidades.

[0010] La presente descripción se refiere a una cantidad de documentos, cuyo contenido queda incorporado a la presente por referencia en su totalidad.

SÍNTESIS DE LA INVENCIÓN

[0011] En un primer aspecto, la presente invención proporciona polipéptidos de fusión que exhiben mayor inmunogenicidad y su uso como vacuna contra IIM causadas por estafilococos.

[0012] Una característica de IIM estafilocócicas tales como IIM por *S. aureus* es la capacidad de *S. aureus* de persistir dentro de las células huéspedes. En particular, las variantes de colonias pequeñas de *S. aureus* (VCP) no generan generalmente infecciones invasivas y pueden ser internalizadas en células huéspedes. Por lo tanto, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona cepas de S. aureus atenuadas vivas para propósitos de vacunas basadas en los aspectos fenotípicos de las VCP para proporcionar una respuesta inmune contra dichas cepas y aumentar la eficacia protectora de las

vacunas.

[0013] En un aspecto, la presente invención proporciona los siguientes puntos:

[0014] Punto 1: Un constructo de fusión de fórmula (I): X-A-ligante-B-Z (I) donde: (1) A and B son idénticos o diferentes y son independientemente: (a) un polipéptido que comprende un polipéptido SACOL0029 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en la FIG. 24 (SEC ID NOs: 5 y 121 a 131), un polipéptido SACOL0264 (SEC ID NO : 185), un polipéptido SACOL0442 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en la FIG. 22D (SEC ID NOs: 29 y 82 a 92), un polipéptido SACOL0718 (SEC ID NO : 186), un polipéptido SACOL0720 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en FIGs. 23I-K (SEC ID NOs: 11 y 109 a 120), un polipéptido SACOL1353 (SEC ID NO : 187), un polipéptido SACOL1416 (SEC ID NO : 188), un polipéptido SACOL1611 (SEC ID NO : 189), un polipéptido SACOL1867 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en FIG. 25D (SEC ID NOs: 152 a 164), un polipéptido SACOL1912 (SEC ID NO : 43), un polipéptido SACOL1944 (SEC ID NO : 190), un polipéptido SACOL2144 (SEC ID NO : 191), un polipéptido SACOL2365 (SEC ID NO : 192), un polipéptido SACOL2385 (SEC ID NO : 50) o un polipéptido SACOL2599 (SEC ID NO : 193), basado en la nomenclatura genética del genoma *Staphylococcus aureus* COL (SACOL) expuesto en la Secuencia de Referencia en el NCBI [siglas en inglés correspondientes a “Centro Nacional para Información Biotecnológica”] NC_002951.2; (b) un polipéptido codificado por un gen de un mismo operón que un gen que codifica al polipéptido de (a); (c) un polipéptido que comprende un fragmento inmunogénico de por lo menos 13 aminoácidos consecutivos de (a) o (b); (d) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 60% idéntica en su totalidad a la secuencia del polipéptido de cualquiera de (a) a (c); o (e) un polipéptido que comprende una variante inmunogénica que comprende por lo menos 13 aminoácidos consecutivos de cualquiera de (a) a (c); (2) el ligante es una secuencia de aminoácidos de por lo menos un aminoácido o está ausente; (3) X está ausente o es una secuencia de aminoácidos de por lo menos un aminoácido; y (4) Z está ausente o es una secuencia de aminoácidos de por lo menos un aminoácido.

[0015] Punto 2: El constructo del punto 1, donde (1) (a) es un polipéptido que comprende un polipéptido SACOL0029 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas

en la FIG. 24 (SEC ID NOs: 5 y 121 a 131), un polipéptido SACOL0442 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en la FIG. 22D (SEC ID NOs: 29 y 82 a 92), un polipéptido SACOL0720 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en las FIGs. 23I-K (SEC ID NOs: 11 y 109 a 120), o un polipéptido SACOL1867 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en la FIG. 25D (SEC ID NOs: 152 a 164).

[0016] Punto 3: El constructo del punto 2, donde al menos uno de A y B es (a) un polipéptido que comprende un polipéptido SACOL0029 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en la FIG. 24 (SEC ID NOs: 5 y 121 a 131); (b) un polipéptido codificado por un gen de un mismo operón que un gen que codifica al polipéptido de (a); (c) un polipéptido que comprende un fragmento inmunogénico de por lo menos 13 aminoácidos consecutivos de (a) o (b); (d) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 60% idéntica en su totalidad a la secuencia del polipéptido de cualquiera de (a) a (c); o (e) un polipéptido que comprende una variante inmunogénica que comprende por lo menos 13 aminoácidos consecutivos de cualquiera de (a) a (d); y el otro de A y B es (a') un polipéptido que comprende un polipéptido SACOL1867 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en la FIG. 25D (SEC ID NOs: 152 a 164); (b') un polipéptido codificado por un gen de un mismo operón que un gen que codifica al polipéptido de (a'); (c') un polipéptido que comprende un fragmento inmunogénico de por lo menos 13 aminoácidos consecutivos de (a') o (b'); (d') un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 60% idéntica en su totalidad a la secuencia del polipéptido de cualquiera de (a') a (c'); o (e') un polipéptido que comprende una variante inmunogénica que comprende por lo menos 12 aminoácidos consecutivos de cualquiera de (a') a (d').

[0017] Punto 4: El constructo del punto 2, donde al menos uno de A y B es (a) un polipéptido que comprende un polipéptido SACOL0442 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en la FIG. 22D (SEC ID NOs: 29 y 82 a 92); (b) un polipéptido codificado por un gen de un mismo operón que un gen que codifica al polipéptido de (a); (c) un polipéptido que comprende un fragmento inmunogénico de por lo menos 13 aminoácidos consecutivos de (a) o (b); (d) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 60% idéntica en su totalidad a la secuencia del polipéptido

de cualquiera de (a) a (c); o (e) un polipéptido que comprende una variante inmunogénica que comprende por lo menos 13 aminoácidos consecutivos de cualquiera de (a) a (d); y el otro de A y B es (a') un polipéptido que comprende un polipéptido SACOL0720 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en las FIGs. 23I-K (SEC ID NOs: 11 y 109 a 120); (b') un polipéptido codificado por un gen de un mismo operón que un gen que codifica al polipéptido de (a'); (c') un polipéptido que comprende un fragmento inmunogénico de por lo menos 13 aminoácidos consecutivos de (a') o (b'); (d') un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 60% idéntica en su totalidad a la secuencia del polipéptido de cualquiera de (a') a (c'); o (e') un polipéptido que comprende una variante inmunogénica que comprende por lo menos 12 aminoácidos consecutivos de cualquiera de (a') a (d').

[0018] Punto 5: El constructo del punto 2, donde A y B son idénticos o diferentes y son (a) un polipéptido que comprende un polipéptido SACOL0720 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en las FIGs. 23I-K (SEC ID NOs: 11 y 109 a 120); (b) un polipéptido codificado por un gen de un mismo operón que un gen que codifica al polipéptido de (a); (c) un polipéptido que comprende un fragmento inmunogénico de por lo menos 13 aminoácidos consecutivos de (a) o (b); (d) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 60% idéntica en su totalidad a la secuencia del polipéptido de cualquiera de (a) a (c); o (e) un polipéptido que comprende una variante inmunogénica que comprende por lo menos 13 aminoácidos consecutivos de cualquiera de (a) a (d).

[0019] Punto 6: El constructo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-2 y 4, donde dicho fragmento inmunogénico (d) comprende una o más de las siguientes secuencias de aminoácidos: KDTINGKSNKSRNW (SEC ID NO: 34); y KDGGKYTLESHKELQ (SEC ID NO: 1).

[0020] Punto 7: El constructo del punto 6, donde dicho fragmento inmunogénico (d) comprende una o más de las siguientes secuencias de aminoácidos : STQNSSSVQDKQLQKVEEVPNNSEKALVKKLYDRYSKDTINGKSNKSRNWVYSERPLNE NQVRIHLEGTYTVAGRVYTPKRNITLNKEVVTLKELDHIIRFAHISYGLYMGEHLPKGNIVIN TKDGGKYTLESHKELQKDRENVKINTADIKNVTFKLVKSVNDIEQV (SEC ID NO: 30); DKQLQKVEEVPNNSEKALVKKLYDRYSKDTINGKSNKSRNWVYSERPLNENQVRIHLEGT

YTVAGRVYTPKRNITLNKEVVTLKELDHIIRFAHISYGLYMGEHLPKGNIVINTK (SEC ID NO :32); y DKQLQKVEEVPNNSEKALVKKLYDRYSKDTINGKSNKSRNWVYSERPLNENQVRIHLEGT YTVAGRVYTPKRNITLNKEVVTLKELDHIIRFAHISYGLYMGEHLPKGNIVINTKDGGKYTLE SHKELQKDRENVKINTADIKNVTFKLVKSVNDIEQV (SEC ID NO : 33).

[0021] Punto 8: El constructo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-2 y 4-5, donde dicho fragmento inmunogénico (d) comprende una o más de las siguientes secuencias de aminoácidos: QFGFDLKHKKDALA (SEC ID NO: 21); TIKDQQKANQLAS (SEC ID NO: 22); KDINKIYFMTDVDL (SEC ID NO: 23); y DVDLGGPTFVLND (SEC ID NO: 24).

[0022] Punto 9: El constructo del punto 8, donde dicho fragmento inmunogénico (d) comprende una o más de las siguientes secuencias de aminoácidos: RASLSSEIKYTAPHDVTIKDQQKANQLASELNNQKIPHFYNYKEVIHTKLYKDNLFDVKAKE PYNVTITSDKYIPNTDLKRGQADLFVAEGSIKDLVKHKKHGKAIIGTKKHHVNIKLRKDINKIY FMTDVDLGGPTFVLNDKDYQEIRKYTKAKHIVSQFGFDLKHKKDALALEKAKNKVDKSIET RSEAISSISSLTG (SEC ID NO : 12); ASLSSEIKYTAPHDVTIKDQQKANQLASELNNQKIPHFYNYKEVIHTKLYKDNLFDVKAKEP YNVTITSDKYIPNTDLKRGQADLFVAEGSIKDLVKHKKHGKAIIGTKKHHVNIKLRKDINKIYF MTDVDLGGPTFVLNDKDYQEIRKYTKAKHIVSQFGFDLKHKKDALALEKAKNKVDKSIETR SEAISSISSLTG (SEC ID NO: 13); ASLSSEIKYTAPHDVTIKDQQKANQLASELNNQKIPHFYNYKEVIHTKLYKDNLFDVKAKEP YNVTITSDKYIPNTDLKRGQADLFVAEGSIKDLVKHKKHGKAIIGTKKHHVNIKLRKDINKIYF MTDVDLGGPTFVLNDKDYQE (SEC ID NO: 14); KDINKIYFMTDVDLGGPTFVLNDKDYQEIRKYTKAKHIVSQFGFDLKHKKDALA (SEC ID NO : 15); KDINKIYFMTDVDLGGPTFVLNDKD (SEC ID NO : 16); KDINKIYFMTDVDLGGPTFVLNDKDY (SEC ID NO : 17); KDINKIYFMTDVDLGGPTFVLND (SEC ID NO : 19); SQFGFDLKHKKDALA (SEC ID NO: 18); y KHIVSQFGFDLKHKKDALA (SEC ID NO: 20).

[0023] Punto 10: El constructo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-3, donde dicho fragmento inmunogénico (c') comprende una o más de las siguientes secuencias de aminoácidos: PYNGVVSFKDATGF (SEC ID NO: 165); AHPNGDKGNGGIYK (SEC ID NO: 167); SISDYPGDEDISVM (SEC ID NO: 169); RGPKGFNFNENVQA (SEC ID NO: 172);

QFESTGTIKRIKDN (SEC ID NO: 175); y GNSGSPVLNSNNEV (SEC ID NO: 178).

[0024] Punto 11: El constructo del punto 10, donde dicho fragmento inmunogénico (d) comprende la siguiente secuencia de aminoácidos: TQVKDTNIFPYNGVVSFKDATGFVIGKNTIITNKHVSKDYKVGDRITAHPNGDKGNGGIYKI KSISDYPGDEDISVMNIEEQAVERGPKGFNFNENVQAFNFAKDAKVDDKIKVIGYPLPAQN SFKQFESTGTIKRIKDNILNFDAYIEPGNSGSPVLNSNNEVIGVVYGGIGKIGSEYNGAVYF TPQIKDFIQKHIEQ (SEC ID NO: 39).

[0025] Punto 12: El constructo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 11, donde el ligante comprende por lo menos cuatro aminoácidos idénticos o diferentes seleccionados del grupo que consiste en glicina, serina, alanina, aspartato, glutamato y lisina.

[0026] Punto 13: El constructo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 12, donde el ligante comprende (GGGGS)n (SEC ID NO: 67), (ERKYK)n (SEC ID NO: 61); o (EAAAK)n (SEC ID NO: 63), donde n=1 a 5.

[0027] Punto 14: El constructo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 13, donde dicha X comprende una polihistidina de 6 a 10 aminoácidos.

[0028] Punto 15: El constructo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 13, donde dicha X está ausente.

[0029] Punto 16: El constructo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 15, donde dicha Z está ausente.

[0030] Punto 17: Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el constructo definido en cualquiera de los puntos 1 a 16.

[0031] Punto 18: Un vector que comprende el ácido nucleico aislado definido en el punto 17.

[0032] Punto 19: Una célula huésped que comprende el vector definido en el punto 18.

[0033] Punto 20: La célula del punto 19, la cual es una forma atenuada viva de *Staphylococcus aureus*.

[0034] Punto 21: La célula del punto 20, donde la forma atenuada viva de *Staphylococcus aureus* tiene un fenotipo de variante de colonias pequeñas (VCP) estabilizado.

[0035] Punto 22: La célula del punto 21, donde la forma atenuada viva de *Staphylococcus aureus* que tiene un fenotipo de VCP estabilizado es un Δ*hemB*Δ720 *S.*

aureus.

[0036] Punto 23: Una composición que comprende: (A) al menos uno de los constructos definidos en cualquiera de los puntos 1 a 16; al menos uno de las moléculas de ácidos nucleicos definidas en el punto 17; al menos uno de los vectores definidos en el punto 18; o al menos uno de las células definidas en cualquiera de los puntos 19 a 22; y (B) (i) el polipéptido definido en cualquiera de los puntos 1 a 11; (ii) un *Staphylococcus aureus* atenuado vivo; (iii) un excipiente farmacéuticamente aceptable; (iv) un adyuvante; o (v) una combinación de por lo menos dos de (i) a (iv).

[0037] Punto 24: La composición del punto 23, donde la forma atenuada viva de *Staphylococcus aureus* expresa: (a) un polipéptido que comprende un polipéptido SACOL0029 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en la FIG. 24 (SEC ID NOs: 5 y 121 a 131), un polipéptido SACOL0264 (SEC ID NO : 185), un polipéptido SACOL0442 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en la FIG. 22D (SEC ID NOs: 29 y 82 a 92), un polipéptido SACOL0718 (SEC ID NO : 186), un polipéptido SACOL0720 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en las FIGs. 23I-K (SEC ID NOs: 11 y 109 a 120), un polipéptido SACOL1353 (SEC ID NO : 187), un polipéptido SACOL1416 (SEC ID NO : 188), SACOL1611 (SEC ID NO : 189), un polipéptido SACOL1867 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en la FIG. 25D (SEC ID NOs: 152 a 164), un polipéptido SACOL1912 (SEC ID NO : 43), SACOL1944 (SEC ID NO : 190), un polipéptido SACOL2144 (SEC ID NO : 191), un polipéptido SACOL2365 (SEC ID NO : 192), un polipéptido SACOL2385 (SEC ID NO : 50) o un polipéptido SACOL2599 (SEC ID NO : 193) basado en la nomenclatura genética del genoma *Staphylococcus aureus* COL (SACOL) expuesto en la Secuencia de Referencia de NCBI NC_002951.2; (b) un polipéptido codificado por un gen de un mismo operón que un gen que codifica al polipéptido de (a); (c) un polipéptido que comprende un fragmento inmunogénico de por lo menos 13 aminoácidos consecutivos de (a) o (b); (d) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 60% idéntica en su totalidad a la secuencia del polipéptido de cualquiera de (a) a (c); o (e) un polipéptido que comprende una variante inmunogénica que comprende por lo menos 13 aminoácidos consecutivos de cualquiera de (a) a (c).

[0038] Punto 25: La composición del punto 23 o 24, donde la forma atenuada viva de

Staphylococcus aureus tiene el fenotipo estabilizado de la variante de colonias pequeñas (VCP).

[0039] Punto 26: La composición de cualquiera de los puntos 23 a 25, donde el adyuvante comprende alumbre, un aceite (por ejemplo, aceite emulsionado, aceite mineral), saponina (por ejemplo, Quil-A™), diguanosina-5'-monofosfato cíclico (c-di-GMP), polifosfasina, indolicidina, patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS, por sus siglas en inglés) o una combinación de por lo menos dos de ellos.

[0040] Punto 27: Un método para prevenir y/o tratar una infección intramamaria estafilocócica (IIM) en un mamífero, comprendiendo dicho método administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz del constructo definido en cualquiera de los puntos 1 a 16; de la molécula de ácido nucleico definida en el punto 17; del vector definido en el punto 18; de la célula definida en cualquiera de los puntos 19 a 22; o de la composición definida en cualquiera de los puntos 23 a 26.

[0041] Punto 28: El método del punto 27, donde dicha IIM estafilocócica es causada por una o más cepas *Staphylococcus aureus*.

[0042] Punto 29: El método del punto 27 o 28, donde dicho mamífero es una vaca.

[0043] Punto 30: Un uso de una cantidad eficaz de (i) el constructo definido en cualquiera de los puntos 1 a 16; (ii) la molécula de ácido nucleico definida en el punto 17; (iii) el vector definido en el punto 18; de la célula definida en cualquiera de los puntos 19 a 22; (iv) la composición definida en cualquiera de los puntos 23 a 26; o (v) una combinación de por lo menos dos de (i) a (iv), para prevenir y/o tratar una infección intramamaria estafilocócica (IIM) en un mamífero.

[0044] Punto 31: El uso del punto 30, donde dicha IIM estafilocócica es causada por una o más cepas de *Staphylococcus aureus*.

[0045] Punto 32: El uso del punto 30 o 31, donde dicho mamífero es una vaca.

[0046] Punto 33: El constructo definido en cualquiera de los puntos 1 a 16; la molécula de ácido nucleico definida en el punto 17; el vector definido en el punto 18; la célula definida en cualquiera de los puntos 19 a 22; la composición definida en cualquiera de los puntos 23 a 26 o una combinación de por lo menos dos de ellos, para utilizar en la prevención y/o tratamiento de una infección intramamaria estafilocócica (IIM) en un mamífero.

[0047] Punto 34: El constructo, molécula de ácido nucleico, vector, célula, composición o combinación del punto 33, donde dicha IIM estafilocócica es causada por una o más cepas de *Staphylococcus aureus*.

[0048] Punto 35: El constructo, molécula de ácido nucleico, vector, célula o composición del punto 33 o 34, donde dicho mamífero es una vaca.

[0049] Punto 36: Un kit para prevenir y/o tratar una infección intramamaria estafilocócica (IIM) en un mamífero que comprende: (A) (i) al menos uno de los constructos definidos en cualquiera de los puntos 1 a 16; (ii) al menos una de las moléculas de ácidos nucleicos definidas en el punto 17; (iii) al menos uno de los vectores definidos en el punto 18; (iv) al menos una de las células definidas en cualquiera de los puntos 19 a 22; o (v) una combinación de por lo menos dos de (i) a (iv), y (B) (i) el polipéptido definido en cualquiera de los puntos 1 a 11; (ii) un *Staphylococcus aureus vivo* atenuado; (iii) un excipiente farmacéuticamente aceptable; (iv) un adyuvante; (v) instrucciones para utilizar el kit para prevenir y/o tratar una infección intramamaria estafilocócica (IIM) en un mamífero; o (vi) una combinación de por lo menos dos de (i) a (v).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0050] En los dibujos adjuntos:

[0051] **FIGs. 1A-D**. muestra títulos de IgG total sérica (FIG. 1A), IgG1 (FIG. 1B), e IgG2 (FIG. 1C) para las vacas vacunadas (9) y con placebo (10) para cada antígeno de la vacuna, básicamente SACOL0029, SACOL0442, SACOL0720, SACOL1867, SACOL1912, y SACOL2385, cuatro semanas después de la segunda inmunización (justo antes de la infección experimental). En la FIG. 1D, la relación IgG2/IgG1 es representada para las vacas vacunadas. En las FIGs. 1A, B y C, los círculos abiertos (○) representan datos para las vacas vacunadas, los cuadrados negros (■) representan los datos para las vacas que recibieron placebo. Cada símbolo representa el título para una vaca. Las líneas horizontales representan las medianas: las líneas discontinuas representan las medianas para las vacas vacunadas mientras que las líneas continuas representan las medianas para las vacas que recibieron placebo. En las FIGs. 1A, B y C, los títulos para las vacas vacunadas son más altos que los títulos para las vacas que recibieron placebo ($P < 0.0001$). En la FIG. 1D, los símbolos representan la relación IgG2/IgG1 para cada vaca. Las líneas horizontales representan las medianas. Las diferentes letras muestran

diferencias estadísticas. ***, P<0.001.

[0052] FIG. 2. muestra la proliferación dependiente del antígeno de células CD4+ sanguíneas de las vacas vacunadas (9) y de las vacas que recibieron placebo (10) cuatro semanas después de la segunda inmunización para cada antígeno. Cada símbolo representa el porcentaje de células CD4+ que han proliferado para cada vaca después de una semana de incubación con el control positivo (ConA) o cada antígeno, básicamente SACOL0029, SACOL0442, SACOL0720, SACOL1867, SACOL1912, y SACOL2385. Los círculos abiertos (○) representan los datos para las vacas vacunadas, los cuadrados negros (■) representan los datos para las vacas que recibieron placebo. Las líneas horizontales representan las medianas: las líneas discontinuas representan las medianas para las vacas vacunadas mientras que las líneas continuas representan las medianas para las vacas que recibieron placebo. Análisis estadístico: Procedimiento mixto de SAS. El símbolo * muestra las diferencias estadísticas entre los grupos vacunados y placebo para los antígenos SACOL0029, SACOL0442, SACOL0720 y SACOL1912 (*, P<0.05). Adicionalmente, la proliferación de células CD8+ fue similar para las vacas vacunadas y aquellas con placebo para todos los antígenos con la excepción del antígeno SACOL0720 para el cual se observó una proliferación más elevada de las células CD8+ para las vacas vacunadas (datos no mostrados).

[0053] FIG. 3. muestra infecciones intramamarias de S. aureus experimentales en vacas lecheras. Cuatro semanas y 4 días después de la segunda inmunización, se realizaron infusiones de 63 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de *S. aureus* en 3 de los 4 cuartos de las vacas vacunadas (9) y las tratadas con placebo (10) en el ordeñe vespertino (día 1, flecha en la **Figura 3**). Se tomaron muestras de leche asépticas en el ordeñe de la mañana y se determinaron los Recuentos de Células Somáticas (RCS) mediante Valacta (Ste-Anne-de-Bellevue, QC). Los círculos abiertos (○) y la línea discontinua representan los datos para las vacas vacunadas, mientras que los cuadrados negros (■) y la línea continua representan los datos para las vacas que recibieron placebo. Cada círculo blanco representa la media de RCS para todos los cuartos infectados de las vacas vacunadas (27) mientras que cada cuadrado representa la media de RCS para todos los cuartos infectados de las vacas que recibieron placebo (30 cuartos). Durante el período de prueba, se descubrió que los recuentos de células

somáticas en la leche eran significativamente inferiores para las vacas vacunadas que para las vacas que recibieron placebo (***; P<0.001).

[0054] FIGs. 4A-C. FIG. 4A muestra la correlación entre UFC y los RCS para cada vaca, y la FIG. 4B muestra la correlación entre el título de IgG1 sérico contra SACOL0442 y RCS para cada vaca. Cada símbolo representa los datos para una vaca. En la FIG. 4A, la misma representa el valor medio de RCS y UFC para los 3 cuartos infectados desde el comienzo hasta el final de la infección. En la FIG. 4B, la misma representa el valor medio de RCS para los 3 cuartos infectados desde el comienzo hasta el final de la infección y el título de IgG1 en suero contra SACOL0442 cuatro semanas después de la segunda inmunización y justo antes de la infección experimental. Los círculos abiertos representan los datos para las vacas vacunadas y los cuadrados negros representan los datos para las vacas que recibieron placebo. Existe una fuerte correlación entre los RCS/ml y las UFC/ml y una correlación negativa entre el RCS y el título de IgG1 contra SACOL0442. En la FIG. 4C, la correlación entre RCS o UFC con relación al título de IgG2 de la leche contra SACOL0029 se muestra para cada vaca diez días después de la infección experimental (6 semanas después de la segunda inmunización). Cada símbolo representa los datos para una vaca diez días después de la infección experimental. Se tomaron muestras de leche asépticas en el ordeñe matutino y se determinaron los recuentos viables de *S. aureus* mediante diluciones 1/10 y plaqueo en placas de agar tríptico de soja (TSA, por sus siglas en inglés) mientras que se determinaron los RCS mediante Valacta (Ste-Anne-de-Bellevue, QC). Los datos de RCS y UFC para cada vaca son el valor medio de los datos para los 3 cuartos infectados diez días después de la infección experimental. Las muestras de leche para la determinación de los títulos de IgG2 de la leche son la mezcla de un volumen equivalente de leche de los 4 cuartos de cada vaca 10 días después de la infección experimental (6 semanas después de la segunda inmunización). Los cuadrados negros (■) representan los datos para las vacas que recibieron placebo, los círculos abiertos (○) representan los datos para las vacas vacunadas.

[0055] FIG. 5. muestra los títulos de IgG totales en suero para las vacas vacunadas para cada antígeno de una vacuna que comprende los antígenos fusionados SACOL0029 y SACOL1867 (mostrados como SACOL0029-1867) y los antígenos SACOL0442 y SACOL0720. En el ELISA, los antígenos buscados fueron SACOL0029-1867,

SACOL0029, SACOL1867, SACOL0442 y SACOL0720. Cada círculo blanco representa el título cuatro semanas después de la segunda inmunización para cada una de las 11 vacas mientras que cada rombo negro representa el título preinmune. Las líneas horizontales representan las medianas: la línea plena para los sueros preinmunes, la línea de puntos para las muestras tomadas cuatro semanas después de la inmunización. Los títulos para las vacas vacunadas son más altos que los títulos de los sueros preinmunes (**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ para los otros antígenos ensayados).

[0056] FIG. 6 muestra los títulos de IgG total en suero contra el antígeno SACOL1867 de ratones inmunizados con la proteína de fusión (SACOL0029-1867; fusión), una combinación de las proteínas separadas (SACOL0029 + SACOL1867; combinación), la proteína SACOL0029 solamente (0029) o la proteína SACOL1867 solamente (1867), en cantidades molares equivalentes. Los círculos abiertos (○) representan los datos para los títulos previos a la inmunización, los cuadrados negros (■) representan los datos para los títulos de la inmunización. Para los títulos previos a la inmunización, se mezclaron sueros preinmunización equitativamente entre los 5 ratones de cada grupo de inmunización para obtener un título del grupo preinmune, representado por un círculo blanco por cada grupo. Para los títulos inmunes, cada símbolo cuadrado representa el título para un ratón. Las líneas horizontales representan las medianas: las líneas negras representan las medianas para los sueros inmunes mientras que las líneas discontinuas (y el círculo blanco) representan las medianas para el grupo de sueros preinmunes. Los títulos para los ratones vacunados en la fusión, combinación y 1867 grupos son más altos que los títulos para los ratones preinmunes ($P< 0.001$), y se descubrió que los títulos de los ratones que recibieron antígeno monovalente SACOL0029 solamente no eran diferentes significativamente de los títulos del grupo preinmune contra SACOL1867. Se muestra la importancia estadística entre los títulos inmunes del grupo de fusión contra la combinación y los dos grupos de vacunas monovalentes (***: $P< 0.001$).

[0057] FIG. 7. La IgG total sérica (según lo medido por O.D. 450 nm en el ensayo ELISA) dirigida contra una secuencia del epítopo de células B **KDGGKYTLESHKELQ** (SEC ID NO: 1) contenida en un fragmento de la secuencia de aminoácidos de SACOL0442 (GEHLPKGNIVINT**KDGGKYTLESHKELQ**KDRENVKINTAD, SEC ID NO: 2), y obtenida de ratones inmunizados con ya sea una fusión de péptidos codificados de SACOL0442 y

SACOL0720 **KDGGKYTLESHKELQ***EAAAKEAAAK***KDINKIYFMTDVDLGGPTFVLND** (SEC ID NO: 3) (Grupo 1) o el péptido **KDGGKYTLESHKELQ** (SEC ID NO: 1) codificado de SACOL0442 (Grupo 2). Cada grupo estaba compuesto por 4 animales (n =4) que recibieron inyecciones dos veces con cantidades equimolares de la secuencia **KDGGKYTLESHKELQ** (SEC ID NO: 1) (correspondiente a 100 µg de **KDGGKYTLESHKELQ***EAAAKEAAAK***KDINKIYFMTDVDLGGPTFVLND** (SEC ID NO: 3) para el Grupo 1 y 31,25 µg de **KDGGKYTLESHKELQ** (SEC ID NO: 1) para el Grupo 2) en un intervalo de 2 semanas, y se prepararon los sueros de sangre recolectada una semana después de la última inyección. El ensayo ELISA se llevó a cabo con muestras séricas diluidas 100 000 veces y se utilizó un fragmento de SACOL0442 (GEHLPKGNIVINT**KDGGKYTLESHKELQ**KDRENVKINTAD, (SEC ID NO: 2)) como el antígeno objetivo que contiene el epítopo péptido **KDGGKYTLESHKELQ** (SEC ID NO: 1). Se expresaron datos individuales como círculos en el gráfico y las medianas mediante barras. Se encontró que la diferencia entre grupos era estadísticamente significativa ($P < 0.0286$, ensayo de Kuskal-Wallis, GraphPad Prism™ 7.00).

[0058] FIGs. 8A-B. Deleción de *hemB* en cepas ATCC29213 y Δ720 de *Staphylococcus aureus*. (FIG. 8A) El gen *hemB* en la cepa del tipo salvaje (WT, por sus siglas en inglés) ATCC29213 y su mutante isogénico Δ720 se delecionó mediante recombinación homóloga y se reemplazó con un casete *ermA* para crear las cepas mutantes Δ*hemB* y Δ720Δ*hemB*, respectivamente. Las líneas gruesas y los números denotan las regiones PCR-amplificadas ilustradas en B para las cepas parentales (1) y las cepas con deleción de *hemB* (2). (FIG. 8B) Productos de PCR de la cepa WT y su mutante Δ*hemB* isogénico (se obtuvieron resultados similares con las cepas Δ720 y Δ720Δ*hemB*).

[0059] FIGs. 9A-C. muestran la influencia de las mutaciones Δ*hemB*, Δ720, y Δ*hemB*Δ720 de *S. aureus* en la infectividad de células MAC-T. Se infectaron células MAC-T con cada una de las cuatro cepas para 3h, luego se incubaron con lisostafina durante 30 min adicionales (t=3h), 12h o 24h y se lisaron para la medición de las bacterias intracelulares viables (UFC). (FIG. 9A) Recuperación relativa del inóculo inicial encontrado dentro de las células en t 3h para Δ720, y (FIG. 9B) para mutantes Δ*hemB*Δ720. Los resultados son normalizados de acuerdo con lo obtenido para ATCC 29213 (WT) o Δ*hemB*, respectivamente, y se expresan como medias con SD (**, $P \leq 0.01$; ***, $P \leq$

0.001; ensayo *t* no apareado). (FIG. 9C) Medias y SD de UFC intracelulares para WT y mutantes en 12h (izquierda) y 24h (derecha). Se empleó un ANOVA de dos vías y ensayo de comparaciones múltiples de Tukey (*: P ≤ 0.05; ***: P ≤ 0.001). Todos los valores indican el valor medio de tres experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado.

[0060] FIG. 10. muestra la persistencia de *S. aureus* ATCC 29213 (WT) y las mutantes isogénicas dentro de las células MAC-T con el transcurso del tiempo. Se infectaron células MAC-T con cada una de las cuatro cepas durante 3h, luego se incubaron con lisostafina durante 30 min. adicionales, 12h o 24h y se lisaron para la medición de bacterias intracelulares (UFC). Las UFC bacterianas intracelulares son expresadas como el porcentaje del inóculo inicial después de ser transformadas en valores logarítmicos base 10 (Log10 UFC/ml). Los valores indican el valor medio de tres experimentos independientes por triplicado con desviaciones estándares.

[0061] FIG. 11. muestra la viabilidad de células MAC-T infectadas mediante *S. aureus* ATCC 29213 (WT) y mutantes isogénicas. Se infectaron células MAC-T con cada una de las cuatro cepas para 3h, luego se incubaron con lisostafina durante 12 h (A) o 24 h (B). Luego se llevaron a cabo ensayos de viabilidad MTT con un método descrito en Kubica et al., 2008. Los resultados son reportados como porcentaje de viabilidad con relación a las células no infectadas y se expresan como la media con SD de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Se compara la importancia estadística con símbolo (Φ) con el WT (ANOVA de dos vías y el ensayo de múltiples comparaciones de Tukey: * o Φ: P ≤ 0.05; **: P≤ 0.01; ***: P ≤ 0.001; ΦΦΦΦ: P ≤ 0.0001).

[0062] FIG. 12. muestra IIM murinas con las cepas parental (WT) y Δ*hemB*Δ720 (ΔΔ). Los ratones fueron infectados según lo descrito previamente y las glándulas se recolectaron a la hora indicada (h) o día (D) después de la infección. Cada columna representa el valor medio de los recuentos UFC bacterianos para un grupo de glándulas, y los rangos son indicados mediante barras. Se empleó un mínimo de seis glándulas por grupo excepto por la cepa WT en D7 (2 glándulas: solamente un ratón sobrevivió). La mortalidad de los ratones en puntos de tiempo específicos es indicada mediante flechas. El asterisco indica el aclaramiento de Δ*hemB*Δ720 de las glándulas (por debajo del límite de detección de 10 UFC/glándula).

[0063] FIG. 13. Doble mutante (Δ720Δ*hemB*) estimula en flujo entrante de neutrófilos en las glándulas mamarias hasta niveles similares en comparación con WT en las primeras 24 horas luego de la infección. Los ratones fueron infectados según lo descrito en materiales y métodos, y un grupo control (PBS) de ratones recibió una inyección de PBS estéril. Se recolectaron las glándulas en tiempos indicados, se homogenizaron y se ensayaron cinéticamente para determinar la actividad de MPO según lo descrito en la sección Materiales y Métodos. Cada punto representa Unidades de MPO para una glándula, lo cual se muestra como valores en bruto ajustados por gramo de glándula. Los valores medios son representados mediante líneas gruesas.

[0064] FIG. 14. Inflamación visual de las glándulas mamarias R4 y L4 24 h después de IIM de ratones con *S. aureus* ATCC 29213 (WT) y el doble mutante Δ720Δ*hemB* (ΔΔ). Se infectaron los ratones según lo descrito en la sección Materiales y Métodos, y los ratones del grupo control (PBS) recibieron una inyección de PBS estéril. Las fotografías muestran glándulas que se recolectaron después de 24 h. En cada panel, se muestran las glándulas R4 (izquierda) y L4 (derecha).

[0065] FIG. 15A. La infiltración de neutrófilos vuelve a los niveles normales después del aclaramiento del doble mutante Δ720Δ*hemB*. Se infectaron los ratones según lo descrito en la sección Materiales y Métodos, y un grupo control (PBS) de ratones recibió una inyección de PBS estéril. Se recolectaron las glándulas en los tiempos indicados, se homogenizaron y se ensayaron cinéticamente para determinar la actividad de MPO según lo descrito en la sección Materiales y Métodos. Las columnas representan los valores medios de Unidades MPO de un grupo de 6 glándulas (4 para el control PBS) ajustados por gramo de glándula, y las barras de error ilustran la desviación estándar. Se muestra la importancia estadística entre los grupos del Día 4 y 12 luego de la infección mediante el símbolo (Φ). Se utilizaron el ANOVA de una vía y los ensayos de comparaciones múltiples de Tukey (ΦΦ: P≤ 0.01; NS: No hay diferencia significativa entre los grupos).

[0066] FIGs. 15B-C. Inmunización de ratones con el mutante doble atenuado vivo (Δ720Δ*hemB*) estimula una respuesta humoral fuerte contra aislados de la mastitis bovina por *S. aureus* de los tipos *spa* encontrados comúnmente. Los ratones fueron inmunizados según lo descrito previamente: se recolectaron los sueros antes de la inmunización por cebado (Preinmune) y diez días después de la inmunización de refuerzo (Inmune). FIG.

15B. Los títulos de IgG suben con el aumento de las dosis de la cepa atenuada viva Δ720*G*Δ*hemB*: cada punto representa el título de IgG total de un ratón contra un extracto de células enteras Δ720*G*Δ*hemB*. Los valores medios son representados mediante líneas gruesas para títulos Inmunes y las líneas discontinuas para los títulos Preinmunes. Se compararon los títulos con sus títulos preinmunes correspondientes (ANOVA de dos vías y ensayo de múltiples comparaciones de Tukey: ****: P ≤ 0.0001). FIG. 15C. Inmunización con el mutante vivo atenuado Δ720*G*Δ*hemB* confiere títulos de IgG contra componentes que son compartidos por cepas de mastitis de tipos *spa* encontrados comúnmente. Cada punto representa el título de IgG total de un ratón contra el extracto de células enteras de la cepa indicada. Los valores medios son representados por líneas gruesas para títulos Inmunes y las líneas discontinuas para títulos Preinmunes. Se compararon todos los títulos inmunes con su título preinmune correspondiente (P ≤ 0.0001) y entre cepas clínicas (ANOVA de dos vías y ensayo de múltiples comparaciones de Sidak: NS: no hay diferencia significativa).

[0067] FIG. **16.** muestra los títulos de IgG sérica total contra la proteína de fusión SACOL0029-1867 de ratones inmunizados con la mezcla proteica (compuesta por 5 μg de los antígenos SACOL0029, SACOL0442, SACOL0720, y la fusión SACOL0029-1867), 10^5 UFC de la cepa viva atenuada Δ720Δ*hemB* sola o una combinación de la mezcla proteica y la cepa Δ720Δ*hemB*. Los círculos abiertos (○) representan los datos para los títulos preinmunes, los cuadrados negros (■) representan los datos para los títulos inmunes. Cada símbolo representa el título para un ratón. Las líneas horizontales representan las medianas: las líneas negras representan las medianas para los sueros inmunes mientras que las líneas discontinuas representan las medianas para los sueros preinmunes. Los títulos para los ratones vacunados en el grupo de la mezcla proteica y el grupo de la combinación son más altos que los títulos para los ratones preinmunes (P< 0.001). Se muestra la importancia estadística entre los títulos inmunes de combinación contra los dos otros grupos de ratones vacunados (**: P< 0.01).

[0068] FIG. 17. muestra los títulos de IgG sérica total contra SACOL0029 de ratones inmunizados con la mezcla proteica (compuesta por 5 μg de los antígenos SACOL0029, SACOL0442, SACOL0720, y la fusión SACOL0029-1867), 10^5 UFC de la cepa viva atenuada Δ720Δ*hemB* sola o una combinación de la mezcla proteica y la cepa

Δ720Δ*hemB*. Los círculos abiertos (○) representan los datos para los títulos preinmunes, los cuadrados negros (■) representan los datos para los títulos inmunes. Cada símbolo representa el título de IgG total para un ratón. Las líneas horizontales representan las medianas: las líneas negras representan las medianas para los sueros inmunes mientras que las líneas discontinuas representan las medianas para los sueros preinmunes. Se muestra la importancia estadística entre los títulos inmunes y preinmunes de los tres grupos de ratones (**: P< 0.01).

[0069] FIG. 18. muestra los títulos de IgG sérica total contra la proteína de superficie estafilocócica ClfA para ratones inmunizados con la mezcla proteica SACOL0029, SACOL0442, SACOL0720, y SACOL0029-1867, 10^5 UFC de la cepa viva atenuada Δ720Δ*hemB* sola o una combinación de la mezcla proteica y Δ720Δ*hemB*. Los círculos abiertos (○) representan los datos para los títulos preinmunes, los cuadrados negros (■) representan los datos para los títulos inmunes. Cada símbolo representa el título para un ratón. Las líneas horizontales representan las medianas: Las líneas negras representan las medianas para los sueros inmunes mientras que las líneas discontinuas representan las medianas para los sueros preinmunes. Se muestra la importancia estadística entre los títulos preinmunes y los títulos inmunes (*: P< 0.05).

[0070] FIG. 19. más adelante muestra la relación sérica de los títulos de IgG2a/IgG1 contra el polipéptido de fusión SACOL0029-1867 para ratones inmunizados con la mezcla proteica, o la combinación de la mezcla proteica y la cepa viva Δ720Δ*hemB* atenuada.

[0071] FIG. 20. muestra las relaciones séricas contra el antígeno SACOL0029. Los cuadrados abiertos (□) representan los datos para los títulos preinmunes, los cuadrados negros (■) representan los datos para los títulos inmunes. Cada símbolo representa la relación de los títulos para un ratón. Las líneas horizontales representan las medianas. Se muestra la importancia estadística entre el grupo de la mezcla proteica en comparación con las relaciones de los grupos de combinación (*: P< 0.05; **: P< 0.01).

[0072] FIGs. **21A-J. I.** Polinucleótidos SACOL0029 (secuencia de longitud completa SEC ID NO: 4) y polipéptidos (secuencias de fragmento(s) y variante(s), de longitud completa SEC ID NOs: 5 a 9). Se muestran epítopos seleccionados sombreados y/o en negrita; **II.** polinucleótidos SACOL0720 (secuencia de longitud completa SEC ID NO: 10) y polipéptidos (secuencias de fragmentos y variante(s), de longitud completa SEC ID NOs:

11 a 27). Se muestran epítopos seleccionados sombreados; **III.** polinucleótidos SACOL0442 (secuencia de longitud completa SEC ID NO: 28) y polipéptidos (secuencias de fragmentos y variante(s), de longitud completa SEC ID NOs: 29 a 36 y 1). Se muestran los epítopos seleccionados sombreados; **IV.** polinucleótidos SACOL1867 (secuencia de longitud completa SEC ID NO: 37) y polipéptidos (secuencias de fragmento(s) y variante(s), de longitud completa SEC ID NOs: 38 a 41). Se muestran los epítopos seleccionados sombreados. El dominio de transmembrana pronosticado (http://www.enzim.hu/hmmtop/html/submit.html) se muestra en negrita; **V.** polinucleótido SACOL1912 (secuencia de longitud completa SEC ID NO: 42) y polipéptidos (secuencias de longitud completa y variante(s) SEC ID NOs: 43 a 44). Se muestran los epítopos seleccionados sombreados (*véase por ejemplo*, SEC ID NOs: 45-48); **VI.** polinucleótido SACOL2385 (SEC ID NO: 49 de longitud completa) y polipéptidos (secuencias de longitud completa y variante(s) SEC ID NOs: 50 a 51). Se muestran los epítopos seleccionados sombreados (*véase por ejemplo*, SEC ID NOs: 52-53); **VII.** Fusiones: **(i)** secuencias de polinucleótidos fusionados SACOL0029-1867 (SEC ID NOs: 54 y 56) y secuencias de polipéptidos (SEC ID NOs: 55, 57-58). En las secuencias de polinucleótidos y polipéptidos, la secuencia con subrayado doble, si la hay, es aquella de la polihistidina, la secuencia en letra cursiva es la secuencia del fragmento SACOL0029, la secuencia subrayada única es la secuencia del ligante y la secuencia en letra negrita es la secuencia del fragmento SACOL1867; **(ii)** secuencia de polipéptidos fusionados SACOL0720-720 (SEC ID NO: 27). En la secuencia de polipéptidos, la secuencia con doble subrayado, si la hay, es aquella de la polihistidina, las secuencia con letra cursiva son las secuencias de los fragmentos SACOL0720 y la secuencia subrayada única es la secuencia del ligante; **(iii)** secuencia de polipéptidos fusionados SACOL0442-720 (SEC ID NO: 3). En el polinucleótido y secuencias de polipéptidos, la secuencia con subrayado doble, si la hay, es aquella de la polihistidina, la secuencia con letras cursivas es la secuencia del fragmento SACOL0442, la secuencia subrayada única es la secuencia del ligante y la secuencia en letras negritas es la secuencia del fragmento SACOL0720; y **VIII.** Secuencias de ligantes (SEC ID NOs: 59 a 70).

[0073] FIGs. 22A-D I. Alineación de múltiples secuencias de polinucleótidos (SEC ID NOs: 71-72, 28, 73 a 81) para SACOL0442 de longitud completa y ortólogos; II. Alineación

de múltiples secuencias de polipéptidos (SEC ID NOs: 29 y 82 a 92) para SACOL0442 de longitud completa, ortólogos y se presentan secuencias consenso derivadas de los mismos. En estas secuencias, "*" denota que los residuos en esa columna son idénticos en todas las secuencias de la alineación, ":" denota que las sustituciones conservadas han sido observadas, y "." denota que se han observado sustituciones semi-conservadas. También se presentan secuencias consenso derivadas de estas alineaciones donde X es cualquier aminoácido. En las secuencias de polipéptidos, se muestran los epítopos seleccionados sombreados (*véase por ejemplo*, SEC ID NOs: 1, 34, 93-97).

[0074] FIGs. 23A-K I. Alineación de múltiples secuencias de polinucleótidos (SEC ID NOs: 98 a 104, 10, y 105 a 108) para SACOL0720 de longitud completa y ortólogos; II. Se presenta la alineación de múltiples secuencias de polipéptidos (SEC ID NOs: 11 y 109 a 120) para SACOL0720 de longitud completa, ortólogos, y secuencias consenso derivadas de los mismos. En estas secuencias, "*" denota que los residuos en esa columna son idénticos en todas las secuencias de la alineación, ":" denota se han observado sustituciones conservadas, y "." denota que se han observado sustituciones semiconservadas. También se presentan secuencias consenso derivadas de estas alineaciones donde X es cualquier aminoácido. En las secuencia de polipéptidos, se muestran los epítopos seleccionados sombreados (*véase por ejemplo*, SEC ID NOs: 22, 19 y 21).

[0075] FIG. 24 Se presenta la alineación de múltiples secuencias polipeptídicas (SEC ID NOs: 5 y 121 a 131) para SACOL0029 de longitud completa, ortólogos y secuencias consenso derivadas de las mismas. En estas secuencias, "*" denota que los residuos en esa columna son idénticos en todas las secuencias de la alineación, ":" denota que se han observado sustituciones conservadas, y "." denota que se han observado sustituciones semiconservadas. Se presentan además secuencias consenso derivadas de estas alineaciones donde X es cualquier aminoácido. En las secuencia de polipéptidos, se muestran los epítopos seleccionados sombreados (*véase por ejemplo*, SEC ID NOs: 132-139). Epítopo en letras negritas identificado por BCPred™. Epítopos sombreados identificados mediante predicciones AAp.

[0076] FIGs. 25A-D. I- Alineación de múltiples secuencias de polinucleótidos (SEC ID NOs: 140 a 151) para SACOL1867 de longitud completa y ortólogos; **II**- Alineación de

múltiples secuencias de polipéptidos (SEC ID NOs: 152 a 164) para SACOL1867 de longitud completa, ortólogos y secuencias consenso derivadas de las mismas. En estas secuencias, "*" denota que los residuos en esa columna son idénticos en todas las secuencias de la alineación, ":" denota que se han observado sustituciones conservadas, y "." denota que se han observado sustituciones semiconservadas. Se presentan además secuencias consenso derivadas de estas alineaciones donde X es cualquier aminoácido. En las secuencia de polipéptidos, se muestran los epítopos seleccionados sombreados (*véase por ejemplo*, SEC ID NOs: 165-180) y el final del dominio del péptido señal y/o el dominio transmembrana se encuentra marcado con una línea (separa el péptido señal y/o el dominio transmembrana de la forma secretada).

[0077] FIG. 26. I – secuencia polinucleotídica (SEC ID NO: 181) para SACOL1715 de longitud completa (hemB); y II-secuencia de aminoácidos (SEC ID NO: 182) para SACOL1715 de longitud completa (*hemB*).

[0078] FIG. 27. I – secuencia polinucleotídica (SEC ID NO: 183) para ClfA de longitud completa (NWMN_0756, newman); y II-secuencia de aminoácidos (SEC ID NO: 184) para ClfA de longitud completa.

DESCRIPCIÓN DE REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

[0079] La presente invención demostró que una fusión de dos antígenos creó una sinergia no esperada en la respuesta inmune.

[0080] Adicionalmente, la presente invención también estabilizó el fenotipo VCP de un Staphylococcus mediante *hemB* (deleción completa menoscabando de ese modo la posibilidad de reversión a un fenotipo invasivo (Tuchscherr, 2011)) posibilitando su uso como un sistema de administración de vacuna. HemB codifica la proteína HemB/ monómero, que se combina para crear la enzima porfobilinógeno sintasa o aminolevulinato dehidratasa [EC 4.2.1.24]. Por añadidura, se obtuvo la atenuación adicional mediante la inactivación de un antígeno de la presente invención, básicamente del gen SACOL0720, el cual ha probado anteriormente que es importante para *S. aureus* en la resistencia a péptidos catiónicos (Falord, 2012; Kawada-Matsuo, 2011; Meehl, 2007) e *in vivo* durante IIM (Allard, 2013). Por lo tanto, esta cepa doble mutante atenuada que expresa los constructos de la presente invención se puede utilizar para la inmunización y protección contra IIM.

Definiciones Generales

[0081] Se presentan los encabezamientos, y otros identificadores, por ejemplo, (a), (b), (i), (ii), etc., meramente para facilitar la lectura de la memoria descriptiva y de las reivindicaciones. El uso de encabezamientos u otros identificadores en la memoria descriptiva o en las reivindicaciones no requiere necesariamente de la realización de las etapas o de los elementos en orden alfabético o numérico o en el orden en el cual se presentan.

[0082] En la presente descripción, se emplean ampliamente una cantidad de términos. A fin de proporcionar una comprensión clara y consistente de la memoria descriptiva y de las reivindicaciones, incluyendo el alcance que se le dará a dichos términos, se proporcionan las siguientes definiciones.

[0083] El uso de la palabra "**un**" o "**una**" cuando se utiliza en conjunto con el término "que comprende" en las reivindicaciones y/o en la memoria descriptiva puede significar "uno" aunque es también consistente con el significado de "uno o más", "por lo menos uno", y "uno o más de uno".

[0084] A lo largo de esta solicitud, el término "**aproximadamente**" se utiliza para indicar que un valor incluye la desviación estándar de error para el dispositivo o método que se está empleando para determinar el valor. En general, la terminología "aproximadamente" tiene el propósito de designar una posible variación de hasta 10%. Por consiguiente, una variación de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10% de un valor se encuentra incluida en el término "aproximadamente". A menos que se indique lo contrario, el uso del término "aproximadamente" antes de un rango es aplicable a ambos extremos del rango.

[0085] En el contexto de esta memoria descriptiva y en las reivindicación(es), las palabras "**que comprende**" (y cualquier forma del verbo comprender, tales como "comprenden" y "comprende"), "que tiene" (y cualquier forma del verbo tener, tal como "tienen" y "tiene"), "que incluye" (y cualquier forma del verbo incluir, tales como "incluye" e "incluyen") o "que contiene" (y cualquier forma del verbo contener, tales como "contiene" y "contienen") son inclusivas o de final abierto y no excluyen etapas del método o elementos adicionales, que no se han mencionado.

[0086] En el presente contexto, el término "**consiste en**" o "**que consiste en** " significa incluyendo solamente los elementos, etapas o ingredientes mencionados específicamente

en la realización reivindicada o reivindicación en particular.

Polipéptidos, ácidos nucleicos y sistemas de administración

[0087] En el presente contexto, el término “vacuna” se refiere a cualquier compuesto / agente (“componente de la vacuna”), o combinaciones de los mismos, capaz de inducir/ provocar una respuesta inmune en un huésped y el cual permite tratar y/o prevenir una infección y/o una enfermedad. Por lo tanto, los ejemplos no limitativos de dicho agente incluyen proteínas, polipéptidos, fragmentos de proteína/ polipéptido, inmunógenos, antígenos, epítopos peptídicos, epítopos, mezclas de proteínas, péptidos o epítopos así como también ácidos nucleicos, genes o porciones de genes (que codifican un polipéptido o proteína de interés o un fragmento del mismo) agregados por separado o en una secuencia contigua tal como en las vacunas de ácidos nucleicos, y similares.

[0088] En un aspecto de la presente invención, se proporciona un constructo de fusión de fórmula I:

[0089] X-A-ligante-B-Z (fórmula (I),

[0090] Donde A y B son idénticos o diferentes y son cada uno independientemente un polipéptido antigénico (es decir, natural, fragmento o variante del mismo) de la presente invención.

[0091] En una realización específica, A y/o B es **(a)** un polipéptido que comprende un polipéptido SACOL0029 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en la FIG. 24 (SEC ID NOs: 5 y 121 a 131), un polipéptido SACOL0264 (SEC ID NO : 185), un polipéptido SACOL0442 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en la FIG. 22D (SEC ID NOs: 29 y 82 a 92), un polipéptido SACOL0718 (SEC ID NO : 186), un polipéptido SACOL0720 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en las FIGs. 23I-J (SEC ID NOs: 11 y 109 a 120), un polipéptido SACOL1353 (SEC ID NO : 187), un polipéptido SACOL1416 (SEC ID NO : 188), SACOL1611 (SEC ID NO : 189), un polipéptido SACOL1867 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en la FIG. 25D (SEC ID NOs: 152 a 164), un polipéptido SACOL1912 según lo expuesto en FIG. 21G-V (SEC ID NO : 43), SACOL1944 (SEC ID NO : 190), un polipéptido SACOL2144 (SEC ID NO : 191), un polipéptido SACOL2365 (SEC ID NO : 192), un polipéptido SACOL2385 según lo expuesto en VI en la FIG. 21H (SEC ID NO :

50) o un polipéptido SACOL2599 (SEC ID NO : 193). En una realización específica, el polipéptido antes mencionado (a) es el fragmento secretado o extracelular del polipéptido definido anteriormente. Los dominios de transmembrana pueden ser pronosticados utilizando, por ejemplo, el software TMpred™ (ExPASy) http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html, http://www.psort.org/psortb/index.html http://www.enzim.hu/hmmtop/html/submit.html y/o *SignIP 4.*1 (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP). TMpred™ y *SignalIP 4.1* pronosticaron el dominio extracelular para: SACOL0720: AA 310-508; SACOL0442 AA 36 a 203. Enzim pronosticó un dominio de transmembrana SACOL1867 (1-40) de tal modo que el dominio extracelular era: AA 41-239 mientras que http://www.psort.org/psortb/index.html pronosticó que SACOL1867 era una proteína extracelular. Puesto que los dominios de transmembrana y/o de péptido señal antes mencionados son putativos, la presente invención abarca los casos en los cuales los antígenos presentados en la presente invención (por ejemplo, SACOL1867) tienen o no un dominio de transmembrana y/o péptido de señal y abarca los correspondientes fragmentos extracelulares. En una realización, el polipéptido mencionado anteriormente es un polipéptido normalmente secretado o expresado en la superficie de las bacterias (por ejemplo, *Staphylococcus aureus*).

[0092] Los números de acceso a la base de datos Genbank para genes *S. aureus* enlistados en la presente invención y sus polipéptidos antigénicos codificados abarcados por la presente invención se ilustran en la Tabla I que aparece a continuación:

Tabla I: Números de acceso a la base de datos Genbank para los genes de *S. aureus* asociados a IIM y polipéptidos codificados descritos en esta invención

Nombre de genes	Nº de ID de Gen de GenBank	Nº de proteína de GenBank
SACOL0029	3236748	YP_184940.1 (SEC ID NO: 5)
SACOL0100	3236858	YP_185004.1
SACOL0101	3236840	YP_185005.1
SACOL0105	3236844	YP_185009.1

SACOL0148	3236734	YP_185048.1
SACOL0154	3238707	YP_185054.1
SACOL0204	3236774	YP_185103.1
SACOL0205	3236775	YP_185104.1
SACOL0264	3236683	YP_185159.1 WP_000570071 (SEC ID NO: 185)
SACOL0442	3236485	YP_185332.1 (SEC ID NO: 29)
SACOL0461	3236475	YP_185351.1
SACOL0608	3236353	YP_185493.1
SACOL0660	3238251	YP_185544.1
SACOL0688	3236721	YP_185570.1
SACOL0690	3236723	YP_185572.1
SACOL0704	3236241	YP_185586.1
SACOL0718	3236599	YP_185600.1 WP_000985996 (SEC ID NO: 186)
SACOL0720	3236600	YP_185601.1 (SEC ID NO: 11)
SACOL0829	3238649	YP_185703.1
SACOL1054	3236163	YP_185919.1
SACOL1142	3236098	YP_186005.1
SACOL1145	3237661	YP_186008.1
SACOL1320	3236394	YP_186175.1
SACOL1353	3236077	YP_186206.1 WP_000603968 (SEC ID NO: 187)
SACOL1416	3236563	YP_186268.1 WP_000548932

		(SEC ID NO: 188)
SACOL1611	3236575	YP_186451.1 WP_001095260 (SEC ID NO: 189)
SACOL1637	3238018	YP_186477.1
SACOL1680	3238476	YP_186520.1
SACOL1781	3236594	YP_186614.1
SACOL1812	3238705	YP_186645.1
SACOL1867	3236101	YP_186695.1 (SEC ID NO: 38)
SACOL1912	3236086	YP_186737.1 (SEC ID NO: 43)
SACOL1944	3237515	YP_186769.1 WP_000149064 (SEC ID NO: 190)
SACOL2092	3238693	YP_186907.1
SACOL2144	3237436	YP_186957.1 WP_000908177 (SEC ID NO: 191)
SACOL2169	3237416	YP_186981.1
SACOL2171	3237418	YP_186983.1
SACOL2321	3238070	YP_187128.1
SACOL2325	3238483	YP_187132.1
SACOL2342	3235997	YP_187148.1
SACOL2365	3238203	YP_187170.1 WP_000827000 (SEC ID NO: 192)
SACOL2379	3237628	YP_187183.1
SACOL2385	3238646	YP_187189.1 (SEC ID NO: 50)

SACOL2599	3237186	YP_187390.1 AAW38600 (SEC ID NO: 193)

[0093] Las secuencias consenso derivadas de las alineaciones de ciertos polipéptidos enlistados con anterioridad son presentadas en las FIGs. 21-25. En una realización específica de estas secuencias consenso, cada X en las secuencias consenso (por ejemplo, las secuencias consenso en las FIGs. 21-25) se define como siendo cualquier aminoácido, o ausente cuando esta posición está ausente en uno o más de los ortólogos presentados en la alineación. En una realización específica de estas secuencias consenso, cada X en las secuencias consenso se define como siendo cualquier aminoácido que constituye una sustitución conservada o semiconservada de cualquiera de los aminoácidos en la posición correspondiente en los ortólogos presentados en la alineación, o está ausente cuando esta posición está ausente en uno o más de los ortólogos presentados en la alineación. En las FIGs. 21-25, se denotan las sustituciones conservadoras mediante el símbolo ":" y las sustituciones semiconservadoras se denotan mediante el símbolo ".". En otra realización, cada X se refiere a cualquier aminoácido que pertenece a la misma clase que cualquiera de los residuos aminoácidos en la posición correspondiente en los ortólogos presentados en la alineación, o ausente cuando esta posición está ausente en uno o más de los ortólogos presentados en la alineación. En otra realización, cada X se refiere a cualquier aminoácido en la posición correspondiente de los ortólogos presentados en la alineación, o ausente cuando esta posición está ausente en uno o más de los ortólogos presentados en la alineación. En una realización específica, A y/o B es un polipéptido que satisface cualquiera de estas secuencias consenso o su fragmento.

[0094] La mutación de aminoácidos conservadores puede incluir la adición, deleción o sustitución de un aminoácido; una sustitución de aminoácidos conservadores se define en la presente como la sustitución de un residuo de aminoácido por otro residuo de aminoácido con propiedades químicas similares (por ejemplo, tamaño, carga o polaridad). Ese tipo de sustitución de aminoácido conservador puede ser un aminoácido básico, neutro, hidrófobo o ácido por otro del mismo grupo (véase por ejemplo, la Tabla II que

aparece más adelante). Mediante el término "aminoácido básico " se quiere hacer referencia a aminoácidos hidrófilos que tienen un valor pK de cadena lateral de más de 7, los cuales generalmente tienen carga positiva a pH fisiológico. Los aminoácidos básicos incluyen histidina (His o H), arginina (Arg o R), y lisina (Lys o K). Mediante el término "aminoácido neutro" (también "aminoácido polar"), se hace referencia a los aminoácidos hidrófilos que tienen una cadena lateral que está sin cargar a pH fisiológico, aunque tiene por lo menos un enlace en el cual el par de electrones compartido en común por dos átomos se mantiene más cercano por uno de los átomos. Los aminoácidos polares incluyen serina (Ser o S), treonina (Thr o T), cisteína (Cys o C), tirosina (Tyr o Y), asparagina (Asn o N), y glutamina (GIn o Q). El término "aminoácido hidrófobo" (también denominado "aminoácido no polar") tiene el propósito de incluir aminoácidos que exhiben una hidrofobicidad mayor a cero de acuerdo con la escala de hidrofobicidad consenso normalizada de Eisenberg (1984). Los aminoácidos hidrófobos incluyen prolina (Pro o P), isoleucina (He o I), fenilalanina (Phe o F), valina (VaI o V), leucina (Leu o L), triptófano (Trp o W), metionina (Met o M), alanina (Ala o A), y glicina (GIy o G). "Aminoácido ácido" se refiere a aminoácidos hidrófilos que tienen un valor pK de cadena lateral inferior a 7, los cuales generalmente tienen carga negativa a pH fisiológico. Los aminoácidos ácidos incluyen glutamato (Glu o E), y aspartato (Asp o D).

[0095] Un aminoácido semiconservado reemplaza un residuo por otro que tiene conformación estérica similar, aunque no comparte propiedades químicas. Los ejemplos de sustituciones semi-conservadoras incluirían la sustitución de cisteína por alanina o leucina; sustitución de serina por asparagina; sustitución de valina por treonina; o sustitución de prolina por alanina.

[0096] La Tabla II que aparece a continuación indica qué aminoácido pertenece a cada clase de aminoácidos.

Clase	Nombre de los aminoácidos
Alifático	Glicina, Alanina, Valina, Leucina, Isoleucina
Que contiene hidróxilo o Azufre /Selenio	Serina, Cisteína, Selenocisteína, Treonina, Metionina

Cíclico	Prolina
Aromático	Fenilalanina, Tirosina, Triptófano
Básico	Histidina, Lisina, Arginina
Ácido y su Amida	Aspartato, Glutamato, Asparagina, Glutamina

[0097] La similitud e identidad entre secuencias de aminoácidos o nucleótidos se puede determinar comparando cada posición en las secuencias alineadas. La alineación óptima de secuencias con motivos comparativos de la similitud y/o identidad puede llevarse a cabo utilizando una variedad de algoritmos, por ejemplo utilizando un programa/ software de alineación de múltiples secuencias bien conocido en la técnica tal como ClustalW™, SAGA™, UGENE™ o T-coffee™. Los ejemplos de alineaciones de secuencias múltiples se describen en los ejemplos que aparecen más adelante y se ilustran en las FIGs 21A a 25.

Operón de gen

[0098] En otra realización, A y/o B es **(b)** un polipéptido codificado por un gen de un mismo operón que un gen que codifica al polipéptido de (a) según lo definido con anterioridad en la presente invención. Por ejemplo, SACOL0718 es un gen del mismo operón que SACOL0720.

Fragmento

[0099] En otra realización, A y/o B es **(c)** un polipéptido que comprende un fragmento inmunogénico de por lo menos 13 aminoácidos consecutivos de (a) o (b) según lo definido con anterioridad en la presente invención.

[00100] Un fragmento inmunogénico de una proteína/ polipéptido se define como parte de una proteína/ polipéptido que es capaz de inducir / provocar una respuesta inmune en un huésped. En una realización, el fragmento inmunogénico es capaz de activar la misma clase de respuesta inmune, aunque no necesariamente en cantidad, que la proteína / polipéptido. Un fragmento inmunogénico de una proteína/polipéptido comprende preferentemente uno o más epítopos de dicha proteína/polipéptido. Un epítopo de una proteína/ polipéptido se define como un fragmento de dicha proteína / polipéptido de por lo menos aproximadamente 4 o 5 aminoácidos de largo, capaz de producir un anticuerpo

específico y/o una célula inmune específica (por ejemplo, una célula T o célula B) que tiene un receptor capaz de unirse específicamente a dicho epítopo. Existen dos tipos diferentes de epítopos: epítopos lineales y epítopos conformacionales. Un epítopo lineal comprende un tramo de aminoácidos consecutivos. Un epítopo conformacional está formado, típicamente, por diversos tramos de aminoácidos conservadores que están plegados en posición y en forma conjunta forman un epítopo en una proteína plegada apropiadamente. Un fragmento inmunogénico, en el presente contexto, se refiere a uno, o ambos, de dichos tipos de epítopos. En una realización en la cual se emplean solamente fragmentos inmunogénicos (es decir, no fusionados en un constructo polipeptídico más grande (por ejemplo, fusión con otro fragmento antigénico)), el fragmento inmunogénico de una proteína/ polipéptido comprende por lo menos 16 residuos de aminoácidos. En una realización adicional, el fragmento inmunogénico comprende por lo menos 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, o 160 aminoácidos consecutivos de la proteína/ polipéptido nativo. En una realización específica, el fragmento tiene por lo menos 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 ,47, 48, 49, 50, o 50 o más aminoácidos consecutivos de la proteína/ polipéptido nativo. En una realización en la cual el por lo menos un fragmento inmunogénico forma parte de un constructo polipeptídico más grande (por ejemplo, fusión con otro polipéptido antigénico, fragmento o variante del mismo), el fragmento inmunogénico comprende por lo menos 13 residuos de aminoácidos consecutivos del polipéptido. Sin estar limitados de ese modo, los fragmentos abarcados por la presente invención comprenden fragmentos inmunogénicos de por lo menos 13 aminoácidos consecutivos de SACOL029 según lo mostrado en la FIG. 21 (y fragmentos correspondientes en ortólogos de SACOL029 (por ejemplo, según lo ilustrado en la FIG. 24); de SACOL0442 como se muestra en la FIG. 21 (y fragmentos correspondientes en ortólogos de SACOL0442 (por ejemplo, según lo ilustrado en la FIG. 22); de SACOL0720 como se muestra en la FIG. 21, (y fragmentos correspondientes en ortólogos de SACOL0720 (por ejemplo, como se ilustra en la FIG. 23); y de SACOL1867 como se muestra en la FIG. 21 (y fragmentos correspondientes en ortólogos de SACOL1867 (por ejemplo, lo ilustrado en la FIG. 25). En otra realización, los

fragmentos abarcados por la presente invención incluyen fragmentos inmunogénicos que comprenden por lo menos un epítopo de proteínas/ polipéptidos antigénicos de la presente invención (polipéptido (a) definido con anterioridad). En otra realización, los fragmentos abarcados por la presente invención incluyen fragmentos inmunogénicos que comprenden por lo menos un epítopo como se ilustra (sombreado) en cualquiera de las proteínas/ polipéptidos antigénicos ilustrados en cualquiera de las FIGs. 21 a 25. Sin estar limitados por ello, los epítopos en una secuencia pueden ser pronosticados con softwares tales como BCPred™, AAP™, FBCPred™ y ABCPred™.

[00101] En una realización, el fragmento inmunogénico mencionado con anterioridad en la presente invención comprende una secuencia que es conservada (es decir, idéntica) en por lo menos dos cepas diferentes de *Staphylococcus aureus.* En realizaciones adicionales, el fragmento inmunogénico mencionado con anterioridad en la presente invención comprende una secuencia que es conservada (es decir, idéntica) en por lo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 cepas diferentes de *Staphylococcus aureus.* En otra realización, las cepas mencionadas con anterioridad de *Staphylococcus aureus* son COL, RF122, NCTC 8325, JH1, JH9, Newman, Mu3, Mu50, USA300-FPR3757, N315, MW2 o MSSA476. En una realización, las cepas mencionadas con anterioridad de *Staphylococcus aureus* están asociadas con la mastitis bovina (por ejemplo, RF122).

Variantes

[00102] En otra realización, el polipéptido mencionado con anterioridad, o un polipéptido sustancialmente idéntico a dicho polipéptido, es expresado en por lo menos dos cepas diferentes de *Staphylococcus aureus*. Sustancialmente idéntico en el presente contexto se refiere a polipéptidos que tienen por lo menos 60% de identidad, en realizaciones por lo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad en sus secuencias de aminoácidos. En realizaciones adicionales, los polipéptidos tienen por lo menos 60%, 65%, 70%,71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad en sus secuencias de aminoácidos con otros polipéptidos con los cuales se comparan.

[00103] En otra realización, A y/o B es **(d)** un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 60% idéntica en su totalidad a la secuencia del polipéptido

de cualquiera de (a) a (c) definida con anterioridad. En otras realizaciones, el aminoácido es por lo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a (a) (por ejemplo, en su longitud completa). En realizaciones adicionales, el aminoácido es por lo menos 60%, 65%, 70%,71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a (a). Por ejemplo, los antígenos ortólogos presentados en alineaciones de las FIGs. 21-25 no son idénticos aunque presentan una cierta identidad con los antígenos o fragmentos con los cuales se comparan. Los consensos presentados en estas FIGs abarcan ese tipo de porcentaje de identidades.

[00104] En otra realización, A y/o B es **(e)** un polipéptido que comprende una variante inmunogénica que comprende por lo menos 13 aminoácidos consecutivos de cualquiera de (a) a (d). Una variante inmunogénica de una proteína/ polipéptido se define como parte de una proteína/ polipéptido que es capaz de inducir/ provocar una respuesta inmune en un huésped. Como el experto en la técnica comprenderá, los agentes (proteínas/polipéptidos, fragmentos de los mismos) que tienen modificaciones no naturales (por ejemplo, variantes inmunogénicas) y los cuales son capaces de inducir una respuesta inmunes específica para el agente no modificado (por ejemplo, capaz de inducir la producción de anticuerpos capaces de reconocer al agente no modificado) están también dentro del alcance del término “componente de vacuna”. Por ejemplo, los componentes de vacuna de la presente invención pueden ser modificados para aumentar su actividad, estabilidad y/o biodisponibilidad, y/o para reducir su toxicidad. Las sustituciones de aminoácidos conservadores pueden realizarse, como por ejemplo reemplazo de un aminoácido que comprende una cadena lateral ácida por otro aminoácido que comprende una cadena lateral ácida, reemplazo de un aminoácido voluminoso por otro aminoácido voluminoso, reemplazo de un aminoácido que comprende una cadena lateral básica por otro aminoácido que comprende una cadena lateral básica, y similares. Un experto en la técnica podrá generar variantes de una proteína/ polipéptido. Esto se realiza, por ejemplo, a través de screening (“selección”) de una genoteca de péptidos o mediante programas de cambio de péptidos. Una variante inmunogénica de acuerdo con la invención tiene esencialmente las mismas propiedades inmunogénicas de dicha proteína en su clase, no necesariamente en cantidad. Una variante inmunogénica de una proteína/ polipéptido de

la invención puede comprender, por ejemplo, una proteína de fusión y/o proteína quimérica. Por ejemplo, la función biológica de una proteína identificada en la presente invención que se pronostica que es una exotoxina, enterotoxina o superantígeno (por ejemplo, SACOL0442) podría interferir potencialmente con el sistema inmune mamífero y producción de anticuerpos, y/o podría mostrar cierta toxicidad en el huésped. Si bien dicha interferencia no fue observada cuando se empleó el polipéptido SACOL0442 en combinación con por ejemplo SACOL0720 durante la inmunización, puede ser útil modificar la proteína o polipéptido empleado para la vacunación de tal modo que se reduzca la actividad biológica de la exotoxina. A tal fin, es posible inactivar la exotoxina con productos químicos (por ejemplo, formaldehído). También es posible emplear técnicas de biología molecular para delecionar o mutar la o las regiones putativas involucradas en la actividad de la exotoxina sin perder inmunogenicidad (Chang *et al.*, 2008). Otro ejemplo es la conjugación o mezcla de componentes basados en aminoácidos con ácidos nucleicos (por ejemplo, genes o porciones de genes agregados por separado o en una secuencia continua) hidratos de carbono tales como aquellos encontrados en cápsulas o biopelículas de polisacáridos microbianos. Otros ejemplos de variantes incluyen antígenos descritos en esta invención o sus fragmentos que comprenden en cualquiera de los dos de sus extremos terminales N o C o insertados dentro de su secuencia de antígeno, un oligopéptido útil para la purificación (por ejemplo, purificación por afinidad) o útil como un espaciador o ligante. Los ejemplos de oligopéptidos útiles para la purificación por afinidad incluyen etiquetas de polihistidina (por ejemplo, 6-10 residuos de histidina que incluyen o no etiquetas RGS (por ejemplo HHHHHH, RGSHHHHHH, o RGSHHHHHGS). A la etiqueta his le puede seguir una secuencia de aminoácidos adecuada para facilitar una remoción de la etiqueta polihistidina utilizando endopeptidasas. Los segmentos “X” y/o “Z” según lo mencionado en la fórmula (I) también pueden comprender ese tipo de oligopéptido útil para la purificación y/o secuencia adecuada para facilitar la remoción de ese tipo de oligopéptido útil para la purificación.

[00105] En realizaciones específicas, el fragmento inmunogénico comprende por lo menos un epítopo del polipéptido (a). Sin estar por ello limitados, en ciertas realizaciones, el fragmento inmunogénico comprende por lo menos un epítopo del polipéptido (a) según lo ilustrado (sombreado) en las secuencias presentadas en las FIGs. 21-25, En otras

realizaciones específicas, las variantes son según lo descrito en las FIGs. 21-25.

Ligante

[00106] La inserción de ligantes entre dominios de proteínas fusionadas puede aumentar la bioactividad aumentando la distancia entre dominios aliviando las potenciales fuerzas repulsivas entre diferentes segmentos (por ejemplo, fragmentos antigénicos) del constructo que da como resultado un plegado proteico mejorado y/o restaurado. Se pueden emplear diferentes secuencias de ligantes de polipéptidos y se sabe que tienen propiedades distintas, tales como ligantes flexibles, rígidos o escindibles. La presente invención abarca el uso de cualquiera de los ligantes de ese tipo incluyendo cualquiera de aquellos enlistados en Chen et. al, Adv Drug Deliv Rev. (2013), 65(10):1357-69 por ejemplo. Los ejemplos de la presente invención proporcionan ilustraciones de ligantes específicos que se utilizaron (es decir, GGGGSGGGGSGGGGS (SEC ID NO: 60), ERKYK (SEC ID NO: 61), y/o EAAAKEAAAK (SEC ID NO: 62)), es decir, estructuras de ligantes flexibles, ricas en aminoácidos hidrófilos pequeños que mantienen distancia entre los dos dominios conectados y mejoran su plegado.

[00107] En otra realización específica, el Fc comprende un dominio CH2, un dominio CH3 y una región bisagra. En otra realización específica, el Fc es un dominio constante de una inmunoglobulina seleccionada del grupo que consiste en IgG-1, IgG-2, IgG-3, IgG-3 e IgG-4. En otra realización específica, el Fc es un dominio constante de una inmunoglobulina IgG-1.

[00108] Pueden incluirse ligantes entre antígenos contiguos de la fusión (por ejemplo, 1 ligante en fusión que comprende dos antígenos, 2 ligantes en fusiones que comprenden tres antígenos, tres ligantes en fusiones que comprenden cuatro antígenos, etc.). En fusiones en las cuales se utilizan dominios de proteínas grandes, el ligante puede ser más grande y puede comprender una región del fragmento cristalizable (Fc).

[00109] En una realización específica, el ligante es una secuencia de aminoácidos de por lo menos un aminoácido o está ausente. En una realización específica, el ligante comprende por lo menos tres (por lo menos 4, 5, 6,7, 8, 9 o 10) aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en glicina, serina, alanina, aspartato, glutamato y lisina. En una realización específica, el ligante es (EAAAK)n (SEC ID NO: 63); (GGGGS)n (SEC ID NO: 67); o (XPXPXP)n (SEC ID NO: 69) donde x es cualquier aminoácido; donde

n es cualquiera de 1 a 5, más específicamente 1, 2, 3, 4 o 5; EAAAKEAAAK (SEC ID NO: 62); EAAAKEAAAKEAAAK (SEC ID NO: 64); GGGGS (SEC ID NO: 67); GGGGSGGGGS (SEC ID NO: 68); GGGGSGGGGSGGGGS (SEC ID NO: 60); XPXPXP (SEC ID NO: 69), donde x es cualquier aminoácido; XPXPXPXPXPXP (SEC ID NO: 70), donde x es cualquier aminoácido; ERKYK (SEC ID NO: 61); ERKYKERKYK (SEC ID NO: 65); ERKYKERKYKERKYK (SEC ID NO: 66). En una realización más específica, el ligante es GGGGSGGGGSGGGGS (SEC ID NO: 60), ERKYK (SEC ID NO: 61), o EAAAKEAAAK (SEC ID NO: 62).

Extremos terminales N y C del constructo

[00110] X y Z son están cada uno independientemente ausentes o son una secuencia de aminoácidos de por lo menos un aminoácido. Sin estar limitados por ello, pueden ser uno o más de aminoácidos que son resultado de la estrategia de clonación, aminoácidos utilizados para facilitar la purificación del constructo (por ejemplo polihistidina), aminoácidos adecuados para facilitar una remoción de la etiqueta de purificación utilizando endopeptidasas. En realizaciones específicas, donde el constructo de fusión comprende tres o más polipéptidos antigénicos, cualquiera de X y/o Z también puede incluir la secuencia de un antígeno adicional (antígeno C, antígeno D, etc.) y, opcionalmente aquella de por lo menos un ligante adicional. Ese tipo de realizaciones donde X y/o Z comprenden uno o más antígenos adicionales y opcionalmente ligantes, podría ilustrarse más específicamente como por ejemplo, fórmula (II) o (III) de la siguiente manera X'-C-ligante$_1$-A-ligante$_2$-B-Z' (II) cuando la fusión comprende por lo menos 3 antígenos; o X'-C-ligante$_1$-A-ligante$_2$-B-ligante$_3$-D-Z' (III) cuando la fusión comprende por lo menos 4 antígenos. En ambas fórmulas (II) y (III) X', Z', ligante$_1$, ligante$_2$, y, en su caso, ligante$_3$, son idénticos o diferentes y son independientemente definidos como lo son X, Z y el ligante en la fórmula (I) definida en esta invención.

[00111] Por consiguiente, en realizaciones específicas, el constructo de fusión comprende 2, 3, 4 o más polipéptidos antigénicos (y, según el caso, otros ligantes). En una realización más específica, y meramente a título enunciativo, el constructo de fusión puede ser SACOL0029_SACOL0442; SACOL0029_SACOL0720; SACOL0029_SACOL1867; SACOL0029_SACOL0720_SACOL1867; SACOL0029_SACOL1867_SACOL0442; SACOL0029_SACOL0720_SACOL0442;

SACOL0442_SACOL0029_SACOL0720; SACOL0442_SACOL0029_SACOL1867; SACOL0442_SACOL1867_SACOL0720; SACOL0720_SACOL0442_SACOL1867; o SACOL0029_SACOL1867_SACOL0720_SACOL0442, o cualquiera de los constructos antes mencionados donde los polipéptidos antigénicos están en cualquier otro orden.

Combinación

[00112] Los constructos de la presente invención pueden emplearse como componente inmunogénico único de una composición (por ejemplo, vacuna) de la presente invención o en combinación con uno o más constructos de fusión adicionales, polipéptidos inmunogénicos, fragmentos o variantes de los mismos y/o bacterias vivas atenuadas (por ejemplo, *S. aureus*) (que expresan o no constructos de fusión y/o polipéptido(s), fragmento(s) o variante(s) de los mismos).

[00113] Uno o más constructos de fusión pueden ser cualquier constructo de fusión inmunogénico que incluye un constructo de fusión adicional según lo definido con anterioridad en la presente invención (véase por ejemplo, el Ejemplo 14).

[00114] El uno o más polipéptido(s) inmunogénico(s), fragmento(s) o variante(s) de los mismos para utilizar en composiciones de la presente invención puede ser cualquier polipéptido, fragmento o variante que contribuya con la inmunogenicidad de las composiciones de la presente invención como se define en la presente invención. Sin estar limitados por ello, dicho(s), polipéptido(s), fragmento(s) o variante(s) incluye(n) (a) un polipéptido que comprende un polipéptido SACOL0029 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en la FIG. 24 (SEC ID NOs: 5 y 121 a 131), un polipéptido SACOL0264 (SEC ID NO : 185), un polipéptido SACOL0442 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en la FIG. 22D (SEC ID NOs: 29 y 82 a 92), un polipéptido SACOL0718 (SEC ID NO : 186), un polipéptido SACOL0720 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en las FIGs. 23I-K (SEC ID NOs: 11 y 109 a 120), un polipéptido SACOL1353 (SEC ID NO : 187), un polipéptido SACOL1416 (SEC ID NO : 188), SACOL1611 (SEC ID NO : 189), un polipéptido SACOL1867 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en la FIG. 25D (SEC ID NOs: 152 a 164), un polipéptido SACOL1912 (SEC ID NO : 43), un polipéptido SACOL1944 (SEC ID NO : 190), un polipéptido SACOL2144 (SEC ID NO : 191), un polipéptido SACOL2365 (SEC ID NO : 192), un polipéptido SACOL2385 (SEC ID NO : 50) o un polipéptido

SACOL2599 (SEC ID NO : 193); (b) un polipéptido codificado por un gen de un mismo operón que un gen que codifica al polipéptido de (a); (c) un polipéptido que comprende un fragmento inmunogénico de por lo menos 13 aminoácidos consecutivos de (a) o (b); (d) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 60% idéntica en su totalidad a la secuencia del polipéptido de cualquiera de (a) a (c); o (e) un polipéptido que comprende una variante inmunogénica que comprende por lo menos 13 aminoácidos consecutivos de cualquiera de (a) a (c), según lo definido con anterioridad en la presente invención. Sin estar limitados por ello, cualquiera de dichos polipéptido(s), fragmento(s) o variante(s) abarca aquellos incluidos en composiciones (por ejemplo, vacunas #1 a # 8) que se ejemplifican en los Ejemplos 1 a 14 y 21-26.

Bacterias vivas atenuadas

[00115] Las bacterias vivas atenuadas (por ejemplo *S. aureus*) para utilizar en las composiciones de la presente invención pueden ser independientes de los constructos de fusión y/o polipéptido(s), fragmento(s) o variante(s) de los mismos de la presente invención, o pueden ser el recipiente para (es decir, pueden expresar) dichos constructos de fusión y/o polipéptido(s), fragmento(s) o variante(s) de los mismos de la presente invención.

[00116] Sin que sea una limitación, según se ilustra en esta invención, las bacterias vivas atenuadas útiles en el contexto de las combinaciones de la presente invención incluyen *Staphylococcus* (por ejemplo, *aureus*) bacterias que tienen por lo menos un gen que contribuye con la virulencia (por ejemplo, Δ720) o que contribuye con la adecuación en el huésped (por ejemplo, un gen metabólico) mutado o delecionado. Sin que sea una limitación, un gen de ese tipo puede ser cualquiera de los genes identificados en Novick 2003, Novick 2008, o Maresso y Schneewind 2008.

[00117] En una realización adicional, las bacterias vivas atenuadas puede ser adicionalmente atenuadas teniendo un fenotipo VCP estabilizado. En el presente contexto, los términos “fenotipo de VCP” se refiere a bacterias que tienen un metabolismo oxidativo disfuncional que causa un crecimiento lento, una alteración en la expresión de factores de virulencia, y una capacidad de ser internalizadas en células huéspedes. En el presente contexto, el término «fenotipo VCP estabilizado » se emplea para denotar una cepa de VCP que retiene al fenotipo VCP, es decir, que es incapaz de producir revertientes

invasivos (es decir, una reversión al fenotipo de crecimiento normal). S. aureus de VCP estabilizado de ese tipo puede ser producido mutando o suprimiendo cualquiera de los genes (por ejemplo, Δ*hemB*) enlistados en la Tabla III que aparece más adelante. Sin limitación alguna, la presente invención abarca el uso del S. aureus de VCP estabilizado ejemplificado en los Ejemplos 15 a 25. Mutación en el presente contexto incluye una sustitución, una deleción y/o una inserción de uno o más nucleótidos que previene la expresión del polipéptido codificado por un gen de la presente invención o que previene la expresión de un polipéptido funcional. en una realización preferida, la mutación previene la expresión del polipéptido. En otra realización específica, las dos mutaciones en la misma cepa viva atenuada o inactivada de *S. aureus* son una deleción o una inserción. Se espera que una cepa mutada de *S. aureus* que tiene una mutación en cualquier posición de uno de los genes de la presente invención que previene la expresión del polipéptido se pueda utilizar como una vacuna viva atenuada de conformidad con la presente invención. Las vacunas vivas atenuadas, es decir, las vacunas que comprenden la bacteria de acuerdo con la invención en una forma viva atenuada, tienen la ventaja con respecto a las vacunas inactivadas de que imitan mejor el modo natural de infección. Por añadidura, sus capacidades de replicación permiten la vacunación con cantidades bajas de bacterias; su número aumentará automáticamente hasta que alcanza el nivel disparador del sistema inmune. Desde ese momento en adelante, el sistema inmune será disparado y finalmente eliminará las bacterias. Una desventaja menor del uso de bacterias vivas atenuadas, sin embargo, podría ser que, inherentemente, queda cierto nivel de virulencia. Esto puede que no sea una desventaja real siempre y cuando el nivel de virulencia sea aceptable, es decir, siempre y cuando la vacuna al menos reduzca los síntomas de la infección bacteriana (por ejemplo, IIM). Naturalmente, cuanto menor sea la virulencia remanente de la vacuna viva atenuada, menos influencia tiene la vacunación sobre el aumento de peso durante/ después de la vacunación.

Tabla III: Números de acceso al Genbank para genes de *S. aureus* asociados con el fenotipo de VCP (Kahl, 2014)

Nombre del Gen	**Nº de ID del Gen en GenBank**	**Nº de Proteína de GenBank**
hemB	3238571 (SACOL1715)	AAW36820.1 WP_000667126.1 GI:446589780 EC:4.2.1.24
menB	3236546 (SACOL1052)	AAW36517.1 WP_000526687.1 GI:446448832 EC:2.2.1.9
thyA	3238178 (SACOL1462)	AAW36663.1 WP_000667126.1 GI:446589780 EC:2.1.1.45
fusA	3236183 (SACOL0593)	AAW37703.1 GI:57285609
FusE (gen: rplF)	3238328 (SACOL2224)	AAW37099.1 GI:57285005
relA (relA2)	3238211 (SACOL1689)	AAW36795.1 GI:57284701 EC:2.7.6.5
cspB	3238398 (SACOl2731)	AAW37379.1 GI:57285285
hemH	3236274 (SACOl1888)	AAW36901.1 GI:57284807 EC:4.99.1.1
ctaA	3237823 (SACOL1124)	AAW38004.1 GI:57285910

Ácidos nucleicos

[00118] El ácido nucleico de la presente invención comprende preferentemente una

secuencia nucleotídica que codifica una o más proteínas/ polipéptidos señalados anteriormente (o sus fragmentos) ligados operativamente a elementos reguladores necesarios para la expresión genética, tales como un promotor, un codón de iniciación, un codón de terminación, potenciadores, y una señal de poliadenilación. Los elementos reguladores se seleccionan, preferentemente, para que sean operables en la especie a la cual se deberán administrar. En realizaciones específicas, el ácido nucleico es de acuerdo con lo ilustrado en las FIGs. 21 a 25.

[00119] Dentro del contexto de la presente invención, está la administración in vivo de un ácido nucleico de la invención a un mamífero de tal modo que una o más proteínas/ polipéptidos (o su fragmento) de interés es/son expresado(s) en el mamífero (por ejemplo, vacuna de ácido nucleico, vacuna de ADN o ARN).

Sistemas de Administración

[00120] El ácido nucleico de la presente vacuna puede ser ADN “desnudo” o se puede incorporar operativamente en un vector. Los ácidos nucleicos pueden ser administrados a células *in vivo* utilizando métodos bien conocidos en la técnica tales como inyección directa de ADN, absorción de ADN mediada por el receptor, transfección mediada por virus o transfección no viral y transfección basada en lípidos, dichos métodos en su totalidad pueden involucrar el uso de vectores. Se ha utilizado la inyección directa para introducir ADN desnudo en células *in vivo* (véase por ejemplo, Acsadi *et al*. (1991) Nature **332**:815-818; Wolff *et al*. (1990) *Science* **247**:1465-1468). Se puede utilizar un aparato de administración (por ejemplo, una "pistola de genes") para inyectar ADN en células *in vivo*. Un aparato de ese tipo puede estar disponibles en el mercado (por ejemplo, de BioRad). El ADN desnudo puede ser también introducido en células complejando el ADN con un catión, tal como polilisina, el cual está acoplado a un ligando para un receptor de superficie celular (véase por ejemplo Wu, G. y Wu, C. H. (1988) *J. Biol. Chem*. **263**: 14621; Wilson *et al*. (1992) *J. Biol. Chem*. **267**: 963-967; y la Pat. de los Estados Unidos de América No. 5.166.320). La unión del complejo ADN-ligando al receptor puede facilitar la absorción del ADN por endocitosis mediada por el receptor. Puede utilizarse un complejo ADN-ligando ligado a cápsides de adenovirus que alteran los endosomas, liberando de ese modo material en el citoplasma, para evitar la degradación del complejo por lisosomas intracelulares (véase por ejemplo Curiel *et al*. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 8850;

Cristiano *et al*. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:2122-2126).

[00121] Los vectores de administración útiles incluyen microcápsulas biodegradables, complejos inmunoestimuladores (ISCOMs, por sus siglas en inglés) o liposomas, y vectores vivos atenuados genéticamente modificados tales como células, virus o bacterias.

[00122] Los vectores liposómicos son vesículas unilamelares o multilamelares, que tienen una porción de membrana formada de material lipófilo y una porción acuosa interior. La porción acuosa se utiliza en la presente invención para contener al material polinucleotídico para que sea administrado a la célula objetivo. En general, se prefiere que los materiales formadores de liposomas tengan un grupo catiónico, tal como un grupo amonio cuaternario, y uno o más grupos lipófilos, tales como grupos alquilo saturados o insaturados que tienen aproximadamente 6 hasta aproximadamente 30 átomos de carbono. Un grupo de materiales adecuados es descrito en la Publicación de Patente Europea No. 0187702, y se describe adicionalmente en la Pat. de Estados Unidos de América No. 6.228.844 a favor de Wolff et al., cuyas descripciones pertinentes quedan incorporadas a modo de referencia. En la bibliografía técnica se describen muchos otros compuestos lipídicos catiónicos formadores de liposomas adecuados. Véase, por ejemplo, L. Stamatatos, et al., Biochemistry 27:3917 3925 (1988); y H. Eibl, et al., Biophysical Chemistry 10:261 271 (1979). Alternativamente, se puede utilizar una microesfera tal como una microesfera biodegradable de poliláctido-coglicólido. Se encapsula un constructo de ácido nucleico o de forma de algún otro modo un complejo con el liposoma o microesfera para la administración del ácido nucleico a un tejido, como es conocido en la técnica.

[00123] Los vectores virales preferidos incluyen Bacteriófagos, virus Herpes, Adenovirus, virus Polio, virus Vaccinia, retrovirus defectuosos, virus adeno-asociados (AAV) y Avipox. Los métodos para la transformación de un vector viral con un constructo de ADN exógeno son también bien conocidos en la técnica. Véase Sambrook y Russell, más arriba.

[00124] Según lo indicado con anterioridad en la presente invención, el ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN) puede ser incorporado en un huésped tal como una célula huésped *in vitro* o *ex vivo* (por ejemplo, una célula inmune tal como una célula dendrítica) o, según lo indicado con anterioridad, en un huésped microbiano atenuado (por ejemplo, *S. aureus*

atenuado, VCP, etc., véase por ejemplo, los Ejemplos 25-26) mediante transfección o transformación, y la célula transfectada o transformada o microorganismo, el cual o la cual expresa al polipéptido (por ejemplo fusión de múltiples antígenos o fragmentos de los mismos y/o antígenos únicos o sus fragmentos) de interés, puede ser administrado al sujeto. Después de la administración, la célula expresará la proteína o polipéptido de interés (o su variante o fragmento) en el sujeto, lo cual, a su vez, conducirá a la inducción de una respuesta inmune dirigida contra la proteína, el polipéptido o su fragmento.

[00125] El uso de bacterias vivas atenuadas para inmunizar y/o administrar constructos específicos o mezcla de antígenos de la presente invención representa un método interesante para mejorar las respuestas inmunes (Griffiths y Khader, 2014). Los organismos vivos atenuados que imitan la infección natural estimulan el sistema inmune en forma poderosa, activando respuestas inmunes amplias y fuertes que producen tanto anticuerpos séricos como de la mucosa, y células T de la memoria y efectoras las cuales actúan de manera sinérgica para proteger contra la enfermedad (Detmer y Glenting, 2006; Kollaritsch et al, 2000; Pasetti et al., 2011). Los ejemplos de vectores bacterianos vivos atenuados adecuados incluyen *S. aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella typhi*, *Shigella*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, Bacilo de Calmette-Guerin (BCG), *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Campylobacter*, o cualquier otro vector bacteriano adecuado, como se conoce en la técnica. Los métodos para transformar vectores bacterianos vivos con un constructo de ADN exógeno son bien descritos en la técnica. Véase, por ejemplo, Joseph Sambrook y David W. Russell, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3ra Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001). La presente invención abarca el uso de una composición que comprende una bacteria viva atenuada (por ejemplo, ΔhemBΔ720 *S. aureus* que expresa el constructo de la presente invención como el único componente inmunogénico o en combinación con otras bacterias vivas atenuadas, expresando cada uno otro polipéptido, fragmento o variante de la presente invención (por ejemplo, SACOL0442, SACOL0720 o sus fragmentos o variantes).

Composiciones

[00126] Los polipéptidos, ácidos nucleicos y sistemas de administración (por ejemplo, células huéspedes que comprenden dichos ácidos nucleicos o vectores) descritos en esta invención se pueden formular para obtener composiciones. En el presente contexto, el

término “farmacéuticamente aceptable” se refiere a componentes de vacuna (por ejemplo, excipientes, portadores, adyuvantes) y composiciones que son fisiológicamente tolerables y no producen en general una reacción adversa alérgica o similar, tal como malestar gástrico, mareos y reacciones similares, cuando se administran a un sujeto. Preferentemente, en el presente contexto, el término “farmacéuticamente aceptable” significa aprobado por la agencia reguladora del gobierno federal o estatal o que figura en la lista de la Farmacopea Estadounidense o en otra farmacopea generalmente reconocida para utilizar en animales, y en seres humanos. El término “excipiente” se refiere a un diluyente, portador, o vehículo con el cual se pueden administrar los componentes de la vacuna de la presente invención. Se pueden emplear soluciones salinas acuosas o agua estéril y soluciones de dextrosa y glicerol estériles como portadores, particularmente para soluciones inyectables.

[00127] En una realización, el agente de la presente invención se administra en combinación con un adyuvante o inmunoestimulante. El adyuvante o inmunoestimulante adecuado que puede mejorar la eficacia de los componentes para inducir una respuesta inmune incluye, entre otros, aceites (por ejemplo, aceites minerales, aceite emulsionado tal como MONTANIDE™ o EMULSIGEN™-D), sales metálicas (por ejemplo, alumbre, hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio), péptidos catiónicos (Bowdish et al., 2005; Hancock, et al., 2000) tal como indolicidina, un péptido catiónico producido mediante las células inmunes de la vaca (Falla et al., 1996), componentes microbianos naturales y artificiales (por ejemplo, liposacáridos bacterianos, adyuvantes de Freund, muramil dipéptido (MDP), diguanosina-5’-monofosfato cíclico (c-di-GMP), patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS) tales como polisacáridos superficiales, lipopolisacáridos, glicanos, peptidoglicano o ADN microbiano (por ejemplo, CpG), componentes vegetales tales como saponinas (por ejemplo, Quil-A™), y/o una o más sustancias que tienen un efecto portador (por ejemplo, bentonita, partículas de látex, liposomas, ISCOM™, ADN y copolímeros de polifosfazina (PCPP)). La inmunización con nanopartículas sintéticas (tales como aquellas preparadas a partir de un polímero sintético biodegradable tal como poli(ácido D,L-láctico-glicólico)) que contiene antígenos más ligandos que señalizan a través de TLR para estimular citoquinas proinflamatorias es también posible (Kasturi et al, 2011).

[00128] Los componentes de la vacuna de la invención se pueden administrar en una composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar en forma de dosificación unitaria. Se puede emplear cualquier vía apropiada de administración, por ejemplo, administración parenteral, subcutánea, intramuscular, intramamaria, intracraneal, intraorbital, oftálmica, intraventricular, intracapsular, intraarticular, intraespinal, intracisternal, intraperitoneal, intranasal, aerosol, o administración oral. Los ejemplos de vías específicas de administración incluyen la administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, intramamaria; oral (por ejemplo, inhalación); transdérmica (tópica); administración de transmucosa, y rectal.

[00129] Se puede emplear la práctica farmacéutica convencional para proporcionar formulaciones o composiciones adecuadas para administrar ese tipo de componentes de vacuna con o sin adyuvantes a sujetos. Los métodos bien conocidos en la técnica para preparar composiciones y formulaciones farmacéuticas se encuentran en, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, (20th ed.) ed. A. R. Gennaro A R., 2000, Lippincott: Philadelphia. Las formulaciones para administración parenteral pueden contener, por ejemplo, excipientes, agua estéril o solución salina, polialquilenglicoles tales como polietilenglicol, migliol, aceites de origen vegetal, o naftalenos hidrogenados. Se pueden utilizar polímero láctido biocompatible, biodegradable, copolímero láctido/ glicólido o copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno para controlar la liberación de los compuestos. Otros sistemas de administración parenteral potencialmente útiles para los compuestos de la invención incluyen partículas de copolímero de acetato etilenvinilo, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables, y liposomas. Las formulaciones para inhalación o inyección intramamaria pueden contener excipientes, por ejemplo, lactosa, o pueden ser soluciones acuosas que contienen, por ejemplo, polioxietilen-9-lauril éter, migliol, glicocolato y deoxicolato, o pueden ser soluciones oleosas (por ejemplo, aceite de parafina) para la administración en forma de gotas nasales, o como un gel.

[00130] Las formulaciones terapéuticas pueden estar en forma de soluciones líquida o suspensión; para la administración oral, las formulaciones pueden estar en forma de comprimidos o cápsulas; y para formulaciones intranasales, en forma de polvos, gotas nasales o aerosoles. Las soluciones o suspensiones utilizadas para aplicación parenteral,

intradérmica, intramamaria o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos (por ejemplo, aceite de parafina), polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol, migliol u otros solventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes tal como ácido etilendiaminatetraacético; agentes reductores tal como ditiotreitol, buffers tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de tonicidad tal como cloruro sódico o dextrosa. Se puede ajustar el pH con ácidos o bases, tal como ácido clorhídrico o hidróxido sódico. Se puede encerrar la preparación parenteral en ampollas, jeringas descartables o frascos de múltiples dosis fabricados de vidrio o plástico.

[00131] Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (hidrosolubles) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa o intramamaria, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor™ ELTM (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés).

[00132] En general, las composiciones orales incluyen un diluyente inerte o un portador comestible. Se pueden encerrar en cápsulas de gelatina o se pueden comprimir para obtener comprimidos o pienso. Para el propósito de la administración de una vacuna oral, se pueden incorporar los componentes activos con excipientes y se pueden utilizar en forma de comprimidos, pastillas, cápsulas o en forma de pienso. Los agentes de unión farmacéuticamente compatibles y/o materiales adyuvantes se pueden incluir como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, pastillas y formas de administración similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante 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 Sterotes; un agente deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente saborizante tal como menta peperina, salicilato de metilo, o sabor a naranja.

[00133] Para la administración por inhalación, los componentes de la vacuna son

administrados en forma de un espray en aerosol de un envase presurizado o dispensador el cual contiene un propulsor adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

[00134] La administración sistémica también puede ser por medio de transmucosa o por vía transdérmica. Para la administración por vía transmucosa o transdérmica, se emplean en la formulación agentes de la penetración apropiados para la permeación de la barrera. Los agentes de la penetración de ese tipo son generalmente conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para administración por transmucosa, detergentes, sales biliares, y derivados del ácido fusídico. Se puede lograr la administración por vía de la transmucosa a través del uso de pulverizaciones nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan para obtener ungüentos, bálsamos, geles, o cremas como es generalmente conocido en la técnica.

[00135] Se pueden emplear también suspensiones liposómicas (incluyendo liposomas que se dirigen a tipos celulares específicos) como portadores farmacéuticamente aceptables.

[00136] Las composiciones farmacéuticas también pueden contener agentes conservantes, agentes solubilizantes, agentes estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, edulcorantes, colorantes, agentes aromáticos, sales para la variación de la presión osmótica, buffers, agentes de recubrimiento o antioxidantes. También pueden contener otros agentes terapéuticamente valiosos.

[00137] La administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intramamaria u oral es una forma de uso preferida. Las dosificaciones en las cuales los componentes de la presente invención se administran en cantidades eficaces dependen de la naturaleza del ingrediente activo específico, el huésped y los requerimientos del sujeto y el modo de aplicación.

Objetivos microbianos

[00138] Se pueden utilizar polipéptidos, ácidos nucleicos y sistemas de administración de la presente invención como agentes antimicrobianos contra infecciones estafilocócicas incluyendo aquellos que causan infección intramamaria (IIM). En una realización preferida, las infecciones estafilocócicas son causadas por *Staphylococcus aureus*.

Métodos para inmunizar con polipéptidos, ácidos nucleicos, vectores, células, composiciones y sistemas de administración

[00139] La inmunización pasiva y activa se encuentra abarcada por los métodos, usos, composiciones farmacéuticas y kits de la presente invención.

[00140] La inmunización pasiva es la inyección de anticuerpos o antisuero, generada previamente contra el patógeno (o los antígenos descritos en esta invención), a fin de proteger o curar a un animal receptor de una infección o infección futura. La protección se desvanece con el transcurso de unas pocas semanas, tiempo durante el cual la inmunización con polipéptidos, ácidos nucleicos o sistemas de administración (por ejemplo, según lo descrito anteriormente en esta invención) tendrá tiempo para generar una respuesta protectora duradera. Se puede generar suero para la inmunización pasiva mediante inmunización de animales donantes utilizando los polipéptidos, ácidos nucleicos o sistemas de administración, según lo descrito en esta invención. Este suero, el cual contiene anticuerpos contra los antígenos, se puede utilizar inmediatamente o se puede almacenar bajo condiciones apropiadas. Se puede utilizar para combatir infecciones agudas (por ejemplo, IIM) o como profiláctico (Tuchscherr *et al*., 2008). El uso de anticuerpos o sueros en una inmunización pasiva se puede combinar con otros agentes tales como un antibiótico para aumentar la velocidad de curación de una infección actualmente en progreso o para aumentar la protección contra una infección inminente.

[00141] La inmunización activa es la administración de los polipéptidos, ácidos nucleicos o sistemas de administración según lo descrito en esta invención a un sujeto.

[00142] Los componentes identificados de conformidad con las enseñanzas de la presente invención tienen un valor profiláctico y/o terapéutico ya que pueden utilizarse para inducir una respuesta inmune para prevenir y/o combatir enfermedades o afecciones, y más particularmente enfermedades o afecciones relacionadas con infecciones microbianas.

[00143] Los términos “prevenir/prevención” o “tratar/tratamiento” en el presente contexto, se refieren a inducir la respuesta biológica deseada, es decir, un efecto profiláctico y terapéutico, respectivamente en un sujeto. De conformidad con la presente invención, el efecto terapéutico comprende uno o más de una disminución/ reducción de la severidad, intensidad y/o duración de la infección microbiana (por ejemplo, infección estafilocócica) o de cualquier síntoma de la misma luego de la administración del polipéptido, ácido nucleico o sistema de administración (agente/composición de la presente invención) de la presente invención cuando se compara con su severidad, intensidad y/o duración en el

sujeto con anterioridad al tratamiento o en comparación con aquella/aquellas en un sujeto control sin tratamiento que tiene la infección o cualquiera de sus síntomas. De conformidad con la invención, un efecto profiláctico puede comprender un retraso en el aparición de la infección microbiana (por ejemplo, infección estafilocócica) o cualquiera de sus síntomas en un sujeto asintomático que se encuentra en riesgo de experimentar la infección microbiana (por ejemplo, infección estafilocócica) o cualquiera de sus síntomas en un tiempo futuro; o una disminución/ reducción de la severidad, intensidad y/o duración de una infección microbiana (por ejemplo, infección estafilocócica) o de cualquiera de sus síntomas que ocurre después de la administración del agente/composición de la presente invención, cuando se comparación con el momento de su inicio o su severidad, intensidad y/o duración en un sujeto control sin tratamiento (es decir, sujeto asintomático que se encuentra en riesgo de experimentar la infección microbiana (por ejemplo, bacteriana) (por ejemplo, infección estafilocócica) o cualquiera de sus síntomas); y/o una disminución/ reducción de la progresión de cualquier infección microbiana preexistente (por ejemplo, infección estafilocócica) o cualquiera de sus síntomas en un sujeto luego de la administración del agente/ composición de la presente invención cuando se compara con la progresión de la infección microbiana (por ejemplo, infección estafilocócica) o cualquiera de sus síntomas en un sujeto control sin tratamiento que tiene una infección microbiana preexistente de ese tipo (por ejemplo, una infección estafilocócica) o cualquiera de sus síntomas. En el presente contexto, en un tratamiento terapéutico, el agente/composición de la presente invención es administrado(a) después de la aparición de la infección microbiana (por ejemplo, infección estafilocócica) o de cualquiera de sus síntomas. En el presente contexto, en un tratamiento profiláctico, el agente/composición de la presente invención es administrado(a) antes de la aparición de la infección microbiana (por ejemplo, infección estafilocócica) o de cualquiera de sus síntomas o después de la aparición de la misma aunque con anterioridad a su progresión.

[00144] En el presente contexto, “disminución” o “reducción” de la infección microbiana (por ejemplo, infección estafilocócica) o de cualquiera de sus síntomas se refiere a una reducción en un síntoma de por lo menos 10% en comparación con un sujeto control (un sujeto no tratado con el agente/composición de la presente invención), en una realización de por lo menos 20% inferior, en una realización adicional de por lo menos 30% inferior,

en una realización adicional de por lo menos 40% inferior, en una realización adicional de por lo menos 50% inferior, en una realización adicional de por lo menos 60% inferior, en una realización adicional de por lo menos 70% inferior, en una realización adicional de por lo menos 80% inferior, en una realización adicional de por lo menos 90% inferior, en una realización adicional de 100% (inhibición completa).

[00145] En el presente contexto, el término “síntoma” en referencia a una infección estafilocócica se refiere a cualquier síntoma de una infección estafilocócica tal como dolor, inflamación, fiebre, vómitos, diarrea, dolor muscular por fatiga, anorexia, deshidratación, presión arterial baja, celulitis, impétigo, síndrome de piel escaldada o forúnculo. Más particularmente, en referencia a una IIM por estafilococos, un síntoma de IIM estafilocócica se refiere, por ejemplo, a anormalidades visuales en la leche (por ejemplo, tal como un aspecto aguachento, escamas, coágulos, mal olor, presencia de sangre), enrojecimiento de la ubre, hinchazón de la ubre, sensibilidad en la ubre, temperatura rectal elevada (>39.0°C), anorexia, disminución de la movilidad y fatiga de la vaca. Un aumento en los recuentos de células somáticas (RCS) de la leche es otra IIM estafilocócica. Las células somáticas de la leche incluyen glóbulos blancos tales como leucocitos o neutrófilos así como también células epiteliales. En general se acuerda que un RCS de >200.000/mL puede representan un síntoma de IIM estafilocócica o es indicativo de una IIM estafilocócica.

Dosificación

[00146] Se puede determinar la toxicidad o eficacia de los componentes de la vacuna para provocar una respuesta inmune mediante procedimientos convencionales en cultivos celulares o en animales experimentales. Se puede medir la relación de la dosis entre los efectos estimuladores del sistema inmunológico y los efectos tóxicos. Se prefieren los componentes que exhiben grandes relaciones. Si bien pueden utilizarse componentes que exhiben efectos colaterales tóxicos, se debe tener cuidado de que se diseñe un sistema de administración a fin de reducir al mínimo el potencial daño a las células y, de ese modo, reducir los efectos colaterales.

[00147] Se pueden utilizar los datos obtenidos de los ensayos de cultivos celulares y de los estudios en animales de laboratorio en la formulación de un rango de dosificación para utilizar en animales grandes y en los seres humanos. La dosificación de componentes de

ese tipo se encuentra preferentemente dentro de un rango de concentraciones administradas que incluyen eficacia con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la ruta de administración utilizada.

[00148] Se puede administrar a un sujeto cualquier cantidad adecuada de la composición farmacéutica. Las dosificaciones dependerán de muchos factores. En general, la cantidad de ingrediente activo contenido dentro de una sola dosis será una cantidad que prevenga de manera eficaz, o que trate la IIM sin inducir toxicidad significativa. El experto en la técnica apreciará que ciertos factores pueden influir sobre la dosificación requerida para inducir eficazmente una respuesta inmune en un sujeto. Adicionalmente, la cantidad terapéuticamente eficaz de los antígenos (por ejemplo, constructos de fusión) de la presente invención pueden requerir una serie de dosis. En general, se considera una cantidad de aproximadamente 0,01 mg - 500 mg de antígenos incluyendo el constructo de fusión por cada dosis. En una realización específica, se considera una cantidad de aproximadamente 0,1 mg – 1 mg de antígenos incluyendo el constructo de fusión por cada dosis. En general, una, dos o tres dosis de la vacuna pueden favorecer el desarrollo óptimo de inmunidad. El tiempo entre dos dosis puede ser tan corto como de tres o cuatro semanas aunque se puede preferir separar la dosis de cebadura (dosis inicial) y la dosis de refuerzo (segunda dosis) en cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez semanas antes de estimular el sistema inmunológico con la inyección de refuerzo. Una inyección de refuerzo posterior (una inyección “recall” o recuerdo) también puede ser óptima para proporcionar una inmunidad sostenible. Esta inyección de refuerzo posterior podría ocurrir, por ejemplo, cada medio año (6 meses), anualmente, cada dos años, cada tres o cada cinco años.

[00149] “Muestra” o “muestra biológica” se refiere a cualquier muestra sólida o líquida aislada de un ser viviente. En una realización particular, se refiere a cualquier muestra sólida (por ejemplo, muestra de tejido) o líquida aislada de un mamífero, tal como leche, un material de biopsia (por ejemplo, muestra de tejido sólido), sangre (por ejemplo, plasma, suero o sangre entera), saliva, líquido sinovial, orina, líquido amniótico y líquido cerebroespinal. Una muestra de ese tipo puede ser, por ejemplo, reciente, fija (por ejemplo, fijada en formalina, alcohol o acetona), incrustada en parafina o congelada con anterioridad al análisis del nivel de expresión del agente infeccioso.

Pacientes

[00150] En el presente contexto, el término “sujeto” o “paciente” se refiere a un animal, preferentemente un mamífero, tal como, entre otros, un ser humano, una vaca (por ejemplo, vaquilla, multípara, primípara, ternera), cabra, oveja, oveja hembra adulta, asno, caballo, cerdo, gallina, gato, perro, etc. el cual es el objeto de tratamiento, observación o experimento. En una realización específica, se trata de una vaca (por ejemplo, que se encuentra en riesgo de experimentar una infección estafilocócica (por ejemplo, IIM)).

[00151] En el presente contexto, los términos “sujeto que corre el riesgo de experimentar una infección estafilocócica (por ejemplo, infección estafilocócica (por ejemplo, IIM) o cualquiera de sus síntomas en un tiempo futuro” se refiere a un mamífero (por ejemplo, una vaca (por ejemplo, vaquilla, multípara, primípara, ternera), cabra, oveja) que se utiliza para la producción de leche o carne.

[00152] En una realización, el mamífero antes mencionado es una vaca.

Método de detección

[00153] Los ejemplos de métodos para medir la cantidad/ nivel de proteínas/ polipéptidos seleccionados incluyen, meramente a título enunciativo: Western blot, inmunoblot, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés), radioinmunoensayo (RIA, por sus siglas en inglés), inmunoprecipitación, resonancia de plasmón superficial, quimiluminiscencia, polarización fluorescente, fosforescencia, análisis inmunohistoquímico, desorción/ionización láser asistida por matriz y analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF, por sus siglas en inglés) espectrometría de masas, microcitometría, microarreglo, microscopía, citometría de flujo, y ensayos basados en una propiedad de la proteína que incluye, meramente a título enunciativo, unión al ADN, unión al ligando, interacción con otros socios proteicos o actividad enzimática.

[00154] En una realización, la cantidad del polipéptido/ proteína dentro de los métodos de la presente invención se detecta utilizando anticuerpos que están dirigidos específicamente contra el polipéptido/ proteína. El término "anticuerpo" en el presente contexto abarca anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpos, siempre y cuando exhiban la actividad o especificidad biológica deseada. "Fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa,

generalmente su región variable o de unión al antígeno. Las interacciones entre anticuerpos y un polipéptido objetivo se detectan mediante medios radiométricos, colorimétricos, o fluorométricos. La detección de complejos antígeno- anticuerpo se puede lograr mediante la adición de un anticuerpo secundario que está acoplado a una etiqueta detectable, tal como, por ejemplo, una enzima, fluoróforo, o cromóforo.

[00155] Los métodos para preparar anticuerpos son bien conocidos en la técnica. Se pueden preparar anticuerpos policlonales mediante la inmunización de un sujeto adecuado (por ejemplo, conejo, cabra, ratón, u otro mamífero) con el polipéptido/ proteína de interés o su fragmento como un inmunógeno. Un "fragmento", "porción" o "segmento" de polipéptido/ proteína es un tramo de residuos de aminoácidos de por lo menos aproximadamente 5, 7, 10, 14, 15, 20, 21 o más aminoácidos del polipéptido señalado con anterioridad. El título de anticuerpo en el sujeto inmunizado se puede monitorear con el transcurso del tiempo mediante técnicas convencionales, como ser con un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) utilizando polipéptido marcador exosómico inmovilizado o un fragmento del mismo. En un tiempo apropiado después de la inmunización, por ejemplo, cuando los títulos de anticuerpo están más altos, se pueden obtener células productoras de anticuerpos del animal, generalmente un ratón, y se pueden utilizar para preparar anticuerpos monoclonales mediante técnicas convencionales, tales como la técnica del hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein (1975) Nature 256: 495-497, la técnica de hibridoma de células B humanas (Kozbor et al. (1983) Immunol. Today 4: 72), la técnica del hibridoma de EBV (Cole et al. (1985) en Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, ed. Reisfeld y Sell (Alan R. Liss, Inc., Nueva York, NY), pp. 77-96) o técnicas de trioma. La tecnología para la producción de hibridomas es bien conocida (véase generalmente Coligan et al., eds. (1994) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY).

[00156] Alternativamente, para preparar hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales, se puede identificar y aislar un anticuerpo monoclonal mediante el screening de una genoteca de inmunoglobulinas combinatoria recombinante (por ejemplo, una genoteca de exhibición en fagos de anticuerpos) con un polipéptido o un fragmento del mismo para aislar de ese modo miembros de la genoteca de inmunoglobulinas que se unen al polipéptido. Los kits para generar y seleccionar genotecas de exhibición en fagos

están disponibles en el mercado (por ejemplo, el sistema Pharmacia Recombinant Phage Antibody System™, Catálogo No. 27-9400-01; y el kit Stratagene SurfZAP™ Phage Display Kit, Catálogo No. 240612).

[00157] Por añadidura, se pueden obtener anticuerpos dirigidos contra uno o más de los polipéptidos/proteínas descritos en esta invención de fuentes comerciales.

[00158] El uso de anticuerpos inmovilizados específicos para los polipéptidos/proteínas es también contemplado por la presente invención y es bien conocido por un experto en la técnica. Los anticuerpos podrían ser inmovilizados sobre diversos soportes sólidos, tales como partículas de matriz magnéticas o cromatográficas, la superficie de un lugar de ensayo (tal como pocillos de microtítulo), pedazos de un material de sustrato sólido (tal como plástico, nilón, papel) y soportes similares. Se puede preparar una tira de ensayo mediante el recubrimiento del anticuerpo o una pluralidad de anticuerpos en un arreglo sobre soporte sólido. Luego, esta tira podría ser sumergida en la muestra de ensayo y luego procesada rápidamente por medio de lavados y etapas de detección para generar una señal medible, tal como una mancha de color.

[00159] El análisis de una pluralidad (2 o más) de polipéptidos/ proteínas se puede llevar a cabo por separado o de manera simultánea con una muestra de ensayo. Se pueden combinar diversos polipéptidos/ proteínas en un ensayo para el procesamiento eficaz de múltiples muestras.

[00160] El análisis de polipéptidos/ proteínas podría llevarse a cabo en diversos formatos físicos también. Por ejemplo, podrían utilizarse placas de microtitulación o automatización para facilitar el procesamiento de grandes cantidades de muestras de ensayo. Alternativamente, se podrían desarrollar formatos de una sola muestra para facilitar el tratamiento inmediato y el diagnóstico en su debido tiempo. Los formatos físicos particularmente útiles comprenden superficies que tienen una pluralidad de sitios discretos y accesibles para la detección de una pluralidad de analitos diferentes. Los formatos de ese tipo incluyen microarreglos proteicos, o “chips de proteínas" (véase, por ejemplo, Ng y Ilag, J. Cell Mol. Med. 6: 329-340, 2002) y dispositivos capilares.

[00161] En una realización, se determina el nivel de expresión mencionado con anterioridad midiendo el nivel de expresión de un ARNm transcripto de dichos uno o más genes.

[00162] Los métodos para determinar los niveles de ácido nucleico (ARNm) son conocidos en la técnica, e incluyen por ejemplo reacción en cadena de la polimerasa (PCR), transcriptasa inversa-PCR (RT-PCR), SAGE, PCR cuantitativa (q-PCR), Southern blot, Northern blot, análisis de secuencias, análisis de microarreglos, detección de un gen reportero, u otras plataformas de hibridación de ADN/ARN. Para la expresión del ARN, los métodos preferidos incluyen, entre otros: extracción de ARNm celular y Northern blotting utilizando sondas etiquetadas que se hibridan a transcriptos que codifican la totalidad o parte de uno o más de los ácidos nucleicos que codifican la proteína/ polipéptido de esta invención; amplificación de ARNm expresado de uno o más de los ácidos nucleicos que codifican las proteínas/ polipéptidos de esta invención utilizando cebadores específicos, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR cuantitativa (q-PCR), y transcriptasa inversa- reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), seguido por la detección cuantitativa del producto mediante cualquiera de diversos medios; extracción de ARN total de la muestra biológica, el cual luego se etiqueta y se utiliza para sondear ADNc u oligonucleótidos que codifican la totalidad o parte de los ácidos nucleicos que codifican las proteínas/ polipéptidos de esta invención, en arreglos sobre cualquiera de diversas superficies.

Kits

[00163] La presente invención abarca además kits que comprenden los componentes de la presente invención. Por ejemplo, el kit puede comprender uno o más componentes. Los componentes se pueden envasar en un envase adecuado y dispositivo para la administración. El kit puede comprender además instrucciones para utilizar el kit.

[00164] La presente invención proporciona además un kit o envase que comprende reactivos útiles para administrar uno o más constructos, polipéptidos, ácidos nucleicos, vectores, huéspedes, composiciones de la presente invención, o una combinación de por lo menos dos de los mismos, a un sujeto que lo necesita para tratar y/o prevenir IIM estafilocócica. Un kit de ese tipo puede comprender además, por ejemplo, instrucciones para la prevención y/o tratamiento de IIM estafilocócicas, envases, reactivos útiles para llevar a cabo los métodos. El kit puede incluir además, en caso necesario, agentes para reducir la interferencia de fondo en un ensayo, agentes para aumentar la señal, software y algoritmos para combinar e interpolar valores marcadores para producir una predicción de

resultado clínico de interés, aparato para conducir un ensayo, curvas de calibración y gráficos, curvas y gráficos de estandarización y similares.

MODO(S) PARA LLEVAR A CABO LA INVENCIÓN

[00165] La presente invención es ilustrada en forma más detallada mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

EJEMPLO 1: Materiales y Métodos para Vacunas que incluyen SACOL0029, SACOL0442, SACOL0720, SACOL1867, SACOL1912 y SACOL2385 (Vacuna #1)

[00166] *Producción de los antígenos.* Se seleccionaron seis antígenos con expresión muy elevada durante la infección intramamaria bovina con *S. aureus* para la inclusión en una primera vacuna bovina (Vacuna #1).Estos antígenos son: SACOL0029 (No. de acceso al GenBank: YP_184940.1) (SEC ID NO: 5), SACOL0442 (YP_185332.1) (SEC ID NO: 29), SACOL0720 (YP_185601.1) (SEC ID NO: 11), SACOL1867 (No. de acceso al GenBank: YP_186695.1) (SEC ID NO: 38), SACOL1912 (No. de acceso al GenBank: YP_186737.1) (SEC ID NO: 43) y SACOL2385 (No. de acceso al GenBank: YP_187189.1) (SEC ID NO: 50). Las proteínas recombinantes con marca de His de SACOL0029, SACOL1867, SACOL1912 y SACOL2385 fueron diseñadas y producidas por GenScript, Inc. (Piscataway, NJ). Las proteínas recombinantes con marca de His de SACOL0442 y SACOL0720 fueron diseñadas y producidas utilizando la tecnología de expresión QIA (plásmido pQE30) de Qiagen Inc. (Mississauga, ON, Canadá), de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes. *Ver en la* FIG. 21 I a VI las secuencias marcadas con his de los antígenos. Los Ejemplos 2-5 y las FIGs. 1-4 se relacionan con esta Vacuna #1.

[00167] *Inmunización de vacas lecheras.* Diecinueve vacas Holstein multíparas sanas en la fase de mitad de lactancia fueron alojadas en un establo con nivel de bioseguridad II en el Dairy y Swine Research y Development Centre of Agriculture y Agri-Food Canada (Centro de Investigación y Desarrollo de Agricultura y Agroalimentación y Productos lácteos y Porcinos de Canadá) (Sherbrooke, QC). Se dividió a las vacas, de manera aleatoria, en dos grupos: un grupo (10 vacas) recibió solución salina (grupo con placebo); el otro grupo (9 vacas) recibió la Vacuna #1 (grupo vacunado). La vacuna estaba compuesta por 300 µg de cada uno de los seis antígenos (SACOL0029, SACOL0720, SACOL1867, SACOL1912, y SACOL2385) combinado con Emulsigen^{TM}-D (MVP Technologies, Omaha, NE), CpG ODN 2007 (TCGTCGTTGTCGTTTTGTCGTT (SEC ID

NO: 194), un patrón molecular asociado a los patógenos (PAMP, por sus siglas en inglés), VIDO, Saskatoon, SW) y el péptido catiónico indolicidina (ILPWKWPWWPWRR (SEC ID NO: 195), utilizado para inducir la respuesta inmune de la vaca (Chemprep Inc., Miami, FL). Se realizaron dos inmunizaciones con 10 semanas de separación, por vía subcutánea en el cuello. No se observaron efectos adversos. Se extrajo sangre de la vena caudal y se tomaron muestras de leche antes de la primera inmunización (sueros preinmunes) y luego cada dos semanas, para la detección de IgG total, IgG1 e IgG2. Se extrajeron volúmenes más grandes de sangre de la vena yugular (se extrajeron 150 ml antes de la primera inmunización y 14 semanas después de la primera inmunización (es decir, 4 semanas después de la segunda inmunización) para el aislamiento de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y análisis de las respuestas inmunes celulares.

[00168] *Detección de IgG total, IgG1 y IgG2 mediante ELISA.* Se llevó a cabo la detección de IgG total, IgG1 e IgG2 contra cada uno de los antígenos en suero y leche de la manera antes descripta, con algunas modificaciones (Ster et al., *Vet. Immunol. Immunopathol.* (2010), 136: 311-318). Nunc MaxiSorp™ Se revistieron placas de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific Inc., Rochester, NY) con el antígeno de ensayo (5 µg/ml diluido en buffer de carbonato/bicarbonato, Sigma Aldrich, Oakville, ON) y se las incubó de un día para otro a 37°C. Seguidamente se saturaron las placas con la PBS que contenía gelatina al 0,5% (BD, Franklin Lakes, NJ) durante 1 h a 37°C. Se cargaron cien microlitros de diluciones dobles en serie de los sueros en PBS con contenido de gelatina al 0,5% y Tween™ 20 al 0,1% en las placas y se los incubó por espacio de 1 h a 37°C. Se lavaron las placas tres veces con PBS que contenía 0,1% de Tween™ 20. Se agregaron a la placa cien microlitros del anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano (HRP). Los anticuerpos secundarios utilizados eran IgG anti–bovina de cabra (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA), una IgG1 anti–bovina de oveja (AbD Serotec, Raleigh, NC) o una IgG2 anti–bovina de oveja (AbD Serotec), diluidos 1/50,000 1/20,000 y 1/20,000 respectivamente, en PBS con contenido de 0,5% de gelatina y 0,1% de Tween™ 20. Al cabo de 1 h de incubación a 37°C seguida por 3 lavados, se detectó la actividad de peroxidasa con el reactivo 3,3',5,5'- tetrametilbencidina

(TMB) (KPL Inc., Gaithersburg, MD) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

[00169] La detección de IgG total, IgG1 e IgG2 en la leche se llevó a cabo usando el mismo procedimiento con pocas modificaciones. Se diluyeron muestras de leche en PBS que contenía 0,5% de gelatina. Se diluyó la IgG2 anti–bovina de oveja 1/10.000 en PBS con contenido de 0,5% de gelatina y 0,1% de Tween^{TM} 20.

[00170] *Evaluación de la respuesta inmune celular*. Se aislaron PBMCs de sangre de la vena yugular y se las marcó con diacetato de carboxifluoresceína, succinimidil éster (CFDA-SE; Molecular Probes Inc., Eugene, OR) de la manera antes descripta (Loiselle et al., *J. Dairy. Sci.* (2009), 92:1900-1912). Al final del procedimiento de marcado con CFDA–SE, se suspendieron las PBMC en medio RPMI que contenía 5% de FBS y 1X antibiótico/antimicótico (A5955, Sigma Chemical Aldrich). Se estimularon las PBMC (5×10^6 células por pocillo) con el mitógeno concanavalina A (ConA; control positivo; Sigma Aldrich) en una concentración final de 1 µg/ml, o cada antígeno (5 µg por pocillo) y se las incubó por espacio de 7 días a 37°C. como control negativo, las PBMC fueron incubadas sin mitógeno alguno. Las estimulaciones se realizaron por duplicado (Ster et al., 2010).

[00171] Se evaluó la proliferación de células CD4+ y CD8+ tras la incubación con los diferentes mitógenos. Se centrifugaron las células a 300 × g durante 5 min, se las suspendió en PBS con un contenido de 0,5% de BSA. A continuación se agregaron las CD8 acopladas con Alexa Fluor^{TM} 647 (diluida 1/20, AbD serotec) y la CD4 anti–bovina de ratón acopladas con rPE (diluido 1/20, AbD serotec). Después de 20 min de incubación sobre hielo, se lavaron las células tres veces con PBS que contenía 0,5% de BSA. Seguidamente se suspendieron las células en PBS con formaldehído al 0,5%. Se determinaron los porcentajes de las poblaciones proliferativas por citometría de flujo en un citómetro de flujo BD FACS Canto II utilizando el software BD FACS Diva.

[00172] *S. aureus Experimental en IIM en vacas lecheras*. Con anterioridad a su uso en IIM experimental, se determinó la relación entre la absorbancia de los cultivos bacterianos (A600 nm) y las UFC. El día del desafío, se transfirió un volumen de un cultivo de un día para otro de *S. aureus* en caldo de Mueller Hinton (MHB; BD) a 200 ml de MHB frescas para obtener una A600 nm de 0,1 y seguidamente se lo cultivó a 35°C hasta que la

A600 nm alcanzó un valor correspondiente a 10^8 UFC/mL en la fase exponencial de desarrollo. La cepa que se ha de utilizar en esta infección experimental (CLJ08-3) había sido caracterizada anteriormente en el laboratorio del co–inventor (Allard et al., *Vet. Microbiol.* (2013) 162: 761- 770). Para las infusiones intramamarias, se diluyeron las bacterias como rutina en PBS estéril (Sigma Aldrich) para obtener aproximadamente 50 UFC en 3 ml. En este experimento, se cultivó el inóculo en TSA y se encontró que contenía 63 UFC en 3 ml.

[00173] Las determinaciones de recuento de células somáticas (RCS) y el análisis bacteriano de muestras asépticas de leche de los cuartos se llevaron a cabo antes de la IIM experimental para garantizar que todas las vacas estuvieran libres de IIM. La infusión experimental de cuartos mamarios con bacterias se realizó en tres de los cuatro cuartos (elegidos al azar) de cada vaca después del ordeñe de la noche de acuerdo con un procedimiento que ya había sido descripto (Petitclerc et al., *J. Dairy. Sci.* (2007), 90: 2778-2787) con pocas modificaciones. En breves términos, antes de la inoculación, se limpian los pezones con gasa embebida en etanol al 70%. Se deja que los pezones sequen al aire antes de la infusión intramamaria de 3 ml de suspensión bacteriana (con un contenido de 63 UFC) en tres de los cuarto cuartos. Inmediatamente después de la infusión, se masajearon todos los cuartos minuciosamente y se sumergieron los pezones en un desinfectante de tetas basado en yodóforos. Durante todo el procedimiento se utilizaron guantes descartables que fueron desinfectados antes de proceder al siguiente animal. Todos los cuartos infundidos con *S. aureus* se infectaron y todas las vacas exhibieron signos clínicos (inflamación y/o mal aspecto de la leche) de mastitis en algún momento durante los pocos primeros días posteriores a la infusión de *S. aureus*.

[00174] *Evaluación de los recuentos de S. aureus viables después de las infecciones experimentales*. Se tomaron muestras asépticas de leche antes del ordeñe matinal tres veces por semana durante las 3 primeras semanas posteriores a la infección experimental y luego dos veces por semana durante las 2 semanas restantes. Una vez descartados los primeros chorros de leche y desinfectados los pezones con etanol al 70%, se recogió de manera aséptica una muestra de leche de 10 ml en un frasco estéril de 50 ml por cada cuarto individual. Las muestras de leche fueron diluidas en serie y se cultivaron 100 µl de cada dilución tanto en placas de agar tríptico de soja (Becton Dickinson) como de sal de

manitol (Becton Dickinson) para las determinaciones de UFC e identificación de *S. aureus*. A continuación, las placas fueron incubadas por espacio de 24 h a 35°C antes de contar las colonias. Se utilizaron las diluciones que exhibieron entre 30 y 300 colonias para calcular la concentración bacteriana. Se cultivó cada dilución por duplicado.

[00175] *Evaluación de los recuentos de células somáticas.* A la misma frecuencia que en el caso de las muestras asépticas de leche, se recogió leche utilizando unidades de ordeñe por glándula mamaria individual en el ordeñe de la mañana y se la pesó para la determinación de la producción de leche por glándula mamaria. También se tomó una muestra no aséptica de 50 ml de cada unidad de ordeñe de glándula mamaria para la determinación del RCS por un laboratorio comercial (Valacta Inc., Ste-Anne-de-Bellevue, QC, Canadá). Se lavaron exhaustivamente las unidades de ordeñe y se las desinfectó con un detergente germicida con base de yodo (K.O. Dyne®, GEA Farm Technologies, Westmoreland, NY) entre sus usos en cada vaca. Todos los demás materiales en contacto con la leche fueron desinfectados con etanol al 70%.

[00176] *Análisis estadístico*. Se llevaron a cabo análisis estadísticos de los datos de la infección experimental utilizando el procedimiento MIXED de SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC) en forma de mediciones repetidas. Para el análisis de RCS y UFC, se transformaron los datos por log10 antes del análisis. Se realizó el análisis estadístico de los títulos de anticuerpo y de la correlación entre UFC y RCS utilizando GraphPad Prism™ v6.05.

[00177] *Declaración de ética.* Todos los experimentos con animales fueron aprobados por el comité institucional local de protección animal de Agricultura y Agroalimentación de Canadá y se llevaron a cabo de conformidad con los lineamientos del Consejo Canadiense de Protección de los Animales (Canadian Council on Animal Care).

EJEMPLO 2: Títulos totales de IgG1 en suero después de la vacunación - Vacuna #1

[00178] Se prepararon y administraron a vacas sanas antígenos recombinantes marcados con His para SACOL0029 (No. de acceso al GenBank: YP_184940.1) (SEC ID NO: 5), SACOL0442 (SEC ID NO: 29), SACOL0720 (SEC ID NO: 11), SACOL1867 (No. de acceso al GenBank: YP_186695.1) (SEC ID NO: 38), SACOL1912 (No. de acceso al GenBank: YP_186737.1) (SEC ID NO: 43), y SACOL2385 (No. de acceso al GenBank: YP_187189.1) (SEC ID NO: 50), de acuerdo con lo descripto en el Ejemplo 1 (*Producción*

de los antígenos e *Inmunización de Vacas lecheras*). Nueve vacas lecheras recibieron la vacuna y 10 vacas recibieron solución salina (placebo). Se detectaron los títulos séricos totales de IgG, IgG1 e IgG2 de acuerdo con lo descripto en el Ejemplo 1 (*Detección de IgG total, IgG1 y IgG2 por ELISA*).

[00179] Como se esperaba, y como se expone en las FIGs 1B-C, la inmunización indujo una producción incrementada de IgG1 y IgG2 en suero antígeno–específico correspondiente al grupo vacunado en comparación con el grupo con placebo. Como nota interesante, la relación IgG2/IgG1 fue 1 en el caso de SACOL0442 (ver la FIG. 1D), lo que es una indicación de una respuesta inmune equilibrada Th1/Th2 a este antígeno. En el caso de los antígenos SACOL0029, SACOL0720, SACOL1912 y SACOL2385, la relación IgG2/IgG1 es significativamente más baja que la relación correspondiente a SACOL0442, lo que indicó que estos antígenos indujeron mayormente una respuesta al anticuerpo IgG1 a través de la vía Th2.

EJEMPLO 3: Proliferación dependiente del antígeno de células sanguíneas CD4+ y CD8+ después de la vacunación- Vacuna #1

[00180] Se evaluó la proliferación dependiente del antígeno de células sanguíneas CD4+ y CD8+ de las vacas vacunadas (9) y las vacas con placebo (10) de acuerdo con lo descripto en el Ejemplo 1 (Evaluación de *la respuesta inmune celular*) cuatro semanas después de la segunda inmunización (inmediatamente antes de la infección experimental) por cada antígeno. Los resultados correspondientes a las células CD4+ están expuestas en la FIG. 2, en la cual cada símbolo representa el porcentaje de células CD4+ que han proliferado por cada vaca al cabo de una semana de incubación con el control positivo (ConA) o cada antígeno. Los círculos blancos (○) representan los datos correspondientes a las vacas vacunadas, los cuadrados negros (■) representan los datos correspondientes a las vacas con placebo. Las líneas horizontales representan las medianas: las líneas de guiones representan las medianas correspondientes a las vacas vacunadas, en tanto que las líneas plenas representan las medianas correspondientes a las vacas con placebo.

[00181] El símbolo * indica las diferencias estadísticas entre los grupos vacunados y con placebo con respecto a los antígenos SACOL0029, SACOL0442, SACOL0720 y SACOL1912 (*, $P<0,05$).

[00182] Además, la proliferación de células CD8+ fue similar en el caso de las vacas

vacunadas y las que recibieron placebo con respecto a todos los antígenos, a excepción del antígeno SACOL0720, ya que se observó una mayor proliferación de las células CD8+ en el caso de las vacas vacunadas (no se exponen datos). La inducción de células CD8+ también pareció ser importante para la resolución de la infección (Riollet et al., 2001; Burton y Erskine, 2003). La vacuna pudo estimular tanto la respuesta inmune celular (CD8+) como humoral (CD4+). La Vacuna #1 con sus diferentes antígenos da lugar a una respuesta inmune balanceada.

EJEMPLO 4: Efecto protector de la vacuna evaluado siguiendo la evolución de los recuentos de células somáticas (RCS) - Vacuna #1

[00183] Se llevó a cabo la infección experimental de IIM por *S. aureus* en vacas lecheras y se la evaluó de acuerdo con lo descripto en el Ejemplo 1 (IIM *Experimental por S. aureus en vacas lecheras*, *Evaluación de los recuentos viables de S. aureus después de las infecciones experimentales*, *Evaluación de los recuentos de células somáticas* y *Análisis estadístico*). Cuatro semanas y 4 días después de la segunda inmunización, se infundieron 63 UFC de *S. aureus* en 3 de los 4 cuartos de las vacas vacunadas (9) y las que recibieron placebo (10) durante el ordeñe nocturno (día 1, flecha de la FIG. 3). Se tomaron muestras asépticas de leche en el ordeñe matutino y se determinó el RCS por Valacta (Ste–Anne-de-Bellevue, QC). Los resultados están expuestos en la FIG. 3, en la cual los círculos blancos (○) y la línea de guiones representan los datos correspondientes a las vacas vacunadas, en tanto que los cuadrados negros (■) y la línea continua representan los datos correspondientes a las vacas con placebo. Cada círculo blanco representa la media de los RCS correspondientes a todos los cuartos infectados de las vacas vacunadas (27) en tanto que cada cuadrado representa la media de los RCS correspondientes a todos los cuartos infectados de las vacas con placebo (30 cuartos).

[00184] Durante el período de desafío, se encontró que el RCS en la leche era significativamente más bajo en las vacas vacunadas que en el caso de las vacas con placebo (***; $P<0.001$), lo que indica menos inflamación y un mejor control de la infección en las vacas vacunadas.

EJEMPLO 5: Correlación entre los RCS o los recuentos viables de *S. aureus* (UFC) con respecto a los títulos de IgG en el suero o leche contra antígenos específicos - Vacuna #1

[00185] Como se ilustra en las FIGs. 4A-B, los RCS se correlacionaron positivamente con las UFC de *S. aureus* del período de desafío (FIG. 4A, r=0,82, P<0,0001) y se correlacionaron negativamente con el título sérico de IgG1 contra t SACOL0442 medido antes de la infección (FIG. 4B, r=-0,49, P<0,05). De esta manera, la vacuna había reducido este criterio de inflamación inducido por el desafío. Se realizó un análisis similar con las muestras recogidas el día 10. Se observaron las mismas correlaciones obtenidas anteriormente, aunque este punto de tiempo en particular los RCS y las UFC de *S. aureus* también se correlacionaron con el título de IgG2 en la leche contra SACOL0029 (Fig. 4C, r=-0,48, P<0,05 y r=-0,58, P<0,05, respectivamente). Estos resultados demuestran que hay más de un antígeno implicado en la respuesta inmune contra la infección.

EJEMPLO 6: Materiales y Métodos para Vacuna que incluyen SACOL0442, SACOL0720, y una fusión entre SACOL1867 y SACOL0029 - Vacuna #2

[00186] *Producción de los antígenos*. Se seleccionaron cuatro antígenos que se expresan profusamente durante la infección intramamaria bovina por *S. aureus* para la inclusión en la Vacuna #2. Los antígenos son polipéptidos codificados por: SACOL0029 (No. de acceso al GenBank: YP_184940.1) (SEC ID NO: 5), SACOL1867 (No. de acceso al GenBank: YP_186695.1) (SEC ID NO: 38), SACOL0442 (SEC ID NO: 29) y SACOL0720 (SEC ID NO: 11). Se incluyeron los antígenos SACOL0029 y SACOL1867 en forma de fusión. Las proteínas recombinantes marcadas con his de SACOL0720 y SACOL0029-1867 fueron diseñadas y producidas por GenScript, Inc. (Piscataway, NJ). Se diseñó y produjo una proteína recombinante marcada con his de SACOL0442 utilizando la tecnología de expresión QIA (plásmido pQE30) de Qiagen Inc. (Mississauga, ON, Canadá), de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes. (ver las FIGs. 21D-E y I, y ítems II, III y VII con respecto a las secuencias marcadas con his de SACOL0720, SACOL0442, y SACOL0029-1867). También se produjo además la proteína superficial ClfA (SEC ID NO: 184), utilizando el vector de expresión de QIA mediante la clonación del gen *clfA* de *S. aureus* ATCC 25904. Esta última proteína recombinante no fue parte de la composición de la vacuna, sino que se la utilizó en los ensayos ELISA para determinar los títulos de IgG en los sueros contra las demás proteínas de *S. aureus* tales como ClfA.

[00187] La vacuna estaba compuesta por 300 µg de cada uno de los 3 antígenos (SACOL0442 y SACOL0720 de acuerdo con lo definido en el Ejemplo 1 y la fusión

SACOL0029-1867) y con Emulsigen™-D (MVP Technologies, Omaha, NE), CpG ODN 2007 (es decir TCGTCGTTGTCGTTTTGTCGTT (SEC ID NO: 194) (IDT, Coralville, IA)) e indolicidina (ILPWKWPWWPWRR (SEC ID NO: 195, GenScript, Piscataway, NJ, Chemprep Inc., Miami, FL) (Vacuna #2).

[00188] *Inmunización de vacas lecheras.* Se albergaron once vacas Holstein multíparas sanas en la etapa media de lactancia en un establo de nivel II de bioseguridad en el Dairy y Swine Research y Development Centre of Agriculture y Agri-Food Canada (Sherbrooke, QC). Las vacas recibieron la Vacuna #2 (grupo vacunado). Se llevaron a cabo dos inmunizaciones con 10 semanas de separación entre sí, por vía subcutánea en el cuello. No se observaron efectos adversos. Se extrajo sangre de la vena caudal y se recogieron muestras de leche antes de la primera inmunización (sueros preinmunes) y luego cada semana para la detección de IgG total.

[00189] *Detección de IgG total por ELISA.* La detección de IgG total contra cada uno de los antígenos en suero se llevó a cabo de la manera antes descripta, con algunas modificaciones (Ster et al., *Vet. Immunol. Immunopathol.* (2010), 136: 311-318). Se revistieron placas Nunc MaxiSorp™ de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific Inc., Rochester, NY) con el antígeno de ensayo (5 µg/ml diluidos en búfer de carbonato/bicarbonato, Sigma Aldrich, Oakville, ON) y se las incubó de un día para otro a 37°C. Seguidamente se saturaron las placas con el PBS que contenía 0,5% de gelatina (BD, Franklin Lakes, NJ) durante 1 h a 37°C. Se cargaron cien microlitros de diluciones dobles en serie de los sueros en PBS que contenía 0,5% de gelatina y 0,1% de Tween™ 20 en las placas y se las incubó por espacio de 1 h a 37°C. Se lavaron las placas tres veces con PBS que contenía 0,1% de Tween™ 20. Se agregaron a la placa cien microlitros del anticuerpo secundario conjuntado a peroxidasa de rábano (HRP). Los anticuerpos secundarios utilizados eran IgG anti–bovina de cabra (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA) diluida 1/1000.000 en PBS que contenía 0,5% de gelatina y 0,1% de Tween™ 20. Al cabo de 1 h de incubación a 37°C seguido por 3 lavados, se detectó la actividad de peroxidasa con el reactivo 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (KPL Inc., Gaithersburg, MD) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

EJEMPLO 7: La fusión de los antígenos induce altos títulos de anticuerpos - Vacuna #2

[00190] La FIG. 5 expone los títulos de IgG total correspondientes a las vacas vacunadas por cada antígeno de la vacuna (incluyendo los antígenos fusionados SACOL0029 y SACOL1867 (rotulados SACOL0029-1867 en la FIG. 5). Cada círculo blanco representa el título cuatro semanas después de la segunda inmunización por cada vaca (inmediatamente antes de la infección experimental) en tanto que cada rombo negro representa el título preinmune. Las líneas horizontales representan las medianas: la línea plena representa los sueros preinmunes, la línea de guiones las muestras tomadas cuatro semanas después de la inmunización. Los títulos correspondientes a las vacas vacunadas son más elevados que los títulos de los sueros preinmunes (**, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ en el caso de los otros antígenos analizados).

[00191] La FIG. 5 demuestra, por consiguiente, que la vacuna compuesta por tres antígenos separados, incluyendo un péptido de fusión, induce una fuerte respuesta inmune en las vacas. Más aun, la FIG. 5 demuestra, sorprendentemente, que los antígenos fusionados SACOL0029 y SACOL1867 (fusión SACOL0029-SACOL1867) elevaron los títulos de anticuerpos que estuvieron por encima de los elevados por cada antígeno solo (Compárese la FIG. 1A con la FIG. 5) y que esos antígenos fusionados otorgan un beneficio adicional a la vacuna.

[00192] Más específicamente, cuando se los administró en forma individual en una vacuna, los títulos de las vacas inmunes contra SACOL0029 y SACOL1867 llegaron a 3200 y 51200, respectivamente (FIG. 1A), en tanto que cuando se administraron los antígenos en forma de fusión, los títulos de las vacas inmunes llegaron a 12800 y 409600, respectivamente (FIG. 5), demostrando que la fusión genera una sinergia inesperada en la respuesta inmune.

EJEMPLO 8: Materiales y Métodos para una vacuna que comprende SACOL0029, SACOL1867 y una fusión entre SACOL1867 y SACOL0029 - Vacuna #3

[00193] *Producción de los antígenos.* Se seleccionaron tres antígenos derivados de dos genes que se expresan abundantemente durante la infección intramamaria por *S. aureus* para la inclusión en una vacuna. Estos antígenos son: SACOL0029 (No. de acceso al GenBank: YP_184940.1) (SEC ID NO: 5), SACOL1867 (No. de acceso al GenBank:

YP_186695.1) (SEC ID NO: 38) y una fusión entre SACOL1867 y SACOL0029 (No. de acceso al GenBank: YP_184940.1) (SEC ID NO: 5). Las proteínas recombinantes marcadas con his de SACOL0029, SACOL1867 y SACOL0029–1867 fueron diseñadas y producidas por GenScript, Inc. (Piscataway, NJ). (remitirse a las FIGs. 21A, F y I, ítems I, IV y VII para ver las secuencias marcadas con his de SACOL0029, SACOL1867 y SACOL0029–1867).

[00194] *Inmunización de ratones*. Se evaluaron las propiedades inmunogénicas de las proteínas recombinantes de *S. aureus* codificadas por los genes SACOL0029, SACOL1867 y una fusión de SACOL0029 y SACOL1867 en ratones. Se compararon cuatro grupos de ratones que recibieron la cantidad equimolar exacta de proteínas, ya sea en forma monovalente (SACOL0029 o SACOL1867) o en forma multivalente (la fusión SACOL0029-1867 o SACOL0029 junto con SACOL1867 en combinación).

[00195] En pocas palabras, se calculó el peso molecular teórico de cada secuencia de aminoácidos correspondiente a la totalidad de la fusión o a la porción de SACOL0029 o SACOL1867 de la fusión utilizando el portal de recursos Bioinformáticos ExPASy™ (http://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool).

[00196] Se administraron cinco microgramos de la fusión a un grupo de ratones. Se determinó que la cantidad molar correspondiente de 5 µg de la fusión SACOL0029-1867 era 168,55 pmol, en lo que respecta a su peso molecular teórico. Se administró una cantidad de 1,15 µg y 3,69 µg de SACOL0029 y SACOL1867, respectivamente, en dos grupos de ratones a fin de producir 168,55 pmol de cada antígeno, respectivamente. El último grupo de ratones recibió la combinación de los dos antígenos individuales (168.55 pmol de cada uno).

[00197] Para la preparación de las dosis para inmunización, se mezclaron individualmente los polipéptidos SACOL0029, SACOL1867 y los de fusión SACOL0029-1867 y se los suspendió en PBS para obtener la cantidad equimolar final de cada dosis antigénica en un volumen de 100 µl. Se dividieron aleatoriamente veinte ratones hembra CD-1 en 4 grupos: el grupo A (5 ratones) recibió 5 µg de la proteína de fusión SACOL0029-1867 (**Fusión**); el grupo B (5 ratones) recibió 1,15 µg de SACOL0029 y 3,69 µg de SACOL1867 (**Combinación**); el grupo C (5 ratones) recibió 1,15 µg de SACOL0029 (**0029**) y el grupo D recibió 3,69 µg de SACOL1867 (**1867**). Los ratones CD-1 fueron inmunizados mediante

dos inyecciones subcutáneas en el cuello con un intervalo de dos semanas. No se observaron efectos secundarios adversos durante la totalidad del período de inmunización experimental. Se extrajeron muestras de sangre justo antes de la primera inyección preparatoria (sueros preinmunes) y diez días después de la inmunización de refuerzo (sueros inmunes). Se dejó que las alícuotas de sangre coagularan a temperatura ambiente durante una hora, se las centrifugó a 10,000 g durante 10 min a 4°C. Se cosecharon los sueros y se los mantuvo a -20°C hasta el posterior análisis.

[00198] *Detección de IgG total por ELISA*. Se realizó la detección de IgG total en suero contra las proteínas recombinantes SACOL0029 y SACOL1867 de la manera antes descripta con algunas modificaciones (Ster et al., *Vet. Immunol. Immunopathol.* (2010), 136: 311-318). Se revistieron placas de 96 pocillos Nunc MaxiSorp™ (Thermo Fisher Scientific Inc., Rochester, NY) con 75 µl de cada uno de los antígenos de ensayo (6,67 µg/ml diluidos en in búfer de carbonato/bicarbonato, Sigma Aldrich, Oakville, ON) y se las incubó de un día para otro a temperatura ambiente. A continuación, se saturaron las placas con PBS que contenía 5% de leche descremada en polvo por espacio de 1 h a 37°C. Se cargaron en las placas cien microlitros de diluciones cuádruples en serie de los sueros en PBS con contenido de 3% de leche y 0, 025% de Tween™ 20 y se las incubó durante 1 h a 37°C. Las placas fueron lavadas tres veces con PBS con contenido de 0,05% de Tween™ 20. Seguidamente se agregaron a la placa cien microlitros de anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano (HRP). El anticuerpo secundario utilizado fue IgG anti–ratón de cabra (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA), diluida 1/5000 en PBS con contenido de 3% de leche y 0, 025% de Tween™ 20. Al cabo de 1 h de incubación a 37°C seguida por 3 lavados, se detectó la actividad de peroxidasa con la adición de cien microlitros del reactivo 3,3',5,5'–tetrametilbencidina (TMB) (KPL Inc., Gaithersburg, MD), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

[00199] *Análisis estadístico.* El análisis estadístico de los títulos de anticuerpos y la correlación se llevó a cabo utilizando GraphPad Prism™ v6.05.

EJEMPLO 9: La fusión de antígenos induce títulos de anticuerpos significativamente superiores en comparación con los antígenos monovalentes o una combinación de antígenos - Vacuna #3

[00200] La FIG. 6 ilustra que un antígeno (SACOL1867) incluido en un polipéptido de

fusión (es decir, la proteína de fusión SACOL0029-1867) puede inducir una respuesta inmune potente y de anticuerpos específicos contra ese antígeno específico (SACOL1867) y, lo que es más importante, que esta respuesta puede ser significativamente superior a la obtenida con una forma monovalente de este antígeno (SACOL1867 administrado solo) o con una combinación multivalente de polipéptidos individuales que son parte de la fusión (combinación de SACOL1867 más SACOL0029). Por consiguiente, además de la ventaja de generar una respuesta inmune contra múltiples dianas polipeptídicas, esos antígenos fusionados también ofrecen el beneficio adicional de mejorar considerablemente los títulos de anticuerpos contra esas dianas.

EJEMPLO 10: Materiales y Métodos para vacunas que incluyen uno o más fragmentos de SACOL0720 y/o uno o más fragmentos de SACOL442 – vacunas #4-6

[00201] *Producción de los antígenos*. Se seleccionaron péptidos y fragmentos de aminoácidos de 15 a 50 aminoácidos de longitud derivados de las secuencias de SACOL0442 y/o SACOL0720 basándose en la presencia de epítopos de células B. También se diseñaron fusiones de epítopos péptidos en las cuales un ligante de aminoácidos (por ejemplo, EAAAKEAAAK (SEC ID NO: 62) o ERKYK (SEC ID NO: 61) o KDYERKYKKHIVS (SEC ID NO: 196)) unía los diversos epítopos. Los péptidos y fragmentos de aminoácidos fueron sintetizados por Biomatik, Inc. (Cambridge, ON). Tras su recepción, se suspendieron los péptidos liofilizados y los fragmentos de aminoácidos en agua estéril a una concentración de 5 mg/ml y se los almacenó a -80 °C hasta el día en que se los usó.

[00202] *Inmunización de ratones*. Se utilizaron péptidos y fragmentos de aminoácidos como antígenos para la inmunización de ratones. Para la preparación de las dosis para la inmunización, se mezcló y suspendió cada péptido y fragmento de aminoácido o una combinación de estos en PBS con contenido de 20 % del adyuvante en emulsión de aceite en agua EMULSIGEN®-D para obtener una dosis final de 100 µg de polipéptido por dosis, a menos que se indique específicamente lo contrario. Se dividieron los ratones hembra CD-1 en forma aleatoria en diferentes grupos de 3 a 4 animales. Los ratones fueron inmunizados mediante dos inyecciones subcutáneas en el cuello con un intervalo de dos semanas. No se observaron efectos secundarios adversos durante la totalidad del período experimental. Se extrajeron muestras de sangre inmediatamente antes de la primera

inyección preparatoria (sueros preinmunes) y diez días después de la inmunización de refuerzo (sueros inmunes). Se dejó que las alícuotas de sangre coagularan a temperatura ambiente durante una hora, y luego se las centrifugó a 10.000 g durante 10 min a 4°C. Se cosecharon los sueros y se los mantuvo a -20°C hasta el posterior análisis.

[00203] *Detección de IgG total por ELISA*. La detección de IgG total en suero, contra secuencias de aminoácidos específicas encontradas en los antígenos utilizados para la inmunización de los ratones se llevó a cabo de la manera antes descripta, con algunas modificaciones (Ster et al., *Vet. Immunol. Immunopathol.* (2010), 136: 311-318). Se revistieron placas de 96 pocillos Nunc MaxiSorp™ (Thermo Fisher Scientific Inc., Rochester, NY) con 100 µl de cada una de las secuencias de aminoácidos objetivo diluida a una concentración final de 5 µg/ml en búfer de carbonato/bicarbonato (Sigma Aldrich, Oakville, ON) y se las incubó de un día para otro a temperatura ambiente. A continuación, se saturaron las placas con PBS con contenido de 5% de leche descremada en polvo por espacio de 1 h a 37°C. Se cargaron en las placas cien microlitros de diluciones cuádruples o dobles en serie de los sueros en PBS con contenido de 1% de leche y 0,025% de Tween™ 20 y se las incubó durante 1 h a 37°C. A continuación, se lavaron las placas tres veces con PBS con contenido de 0,05% de Tween™ 20. Luego se agregaron a las placas cien microlitros del anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano (HRP). El anticuerpo secundario utilizado era IgG anti–ratón de cabra (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA), diluida 1/5000 en PBS con contenido de 1% de leche y 0,025% de Tween™ 20. Al cabo de 1 h de incubación a 37°C seguida por 3 lavados con PBS Tween™ 20 y un lavado final con PBS, se detectó la actividad de peroxidasa con el reactivo 3,3',5,5'–tetrametilbencidina (TMB) (KPL Inc., Gaithersburg, MD) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

[00204] *Análisis estadístico*. El análisis estadístico de los títulos de anticuerpos y de las densidades ópticas se llevó a cabo utilizando GraphPad Prism™ v6.05.

EJEMPLO 11: Respuesta inmune contra una fusión de péptidos que incluye epítopos codificados a partir de las secuencias SACOL0442 y SACOL0720 - Vacuna #4

[00205] Se utilizó una fusión de epítopos peptídicos codificados de SACOL0442 y SACOL0720 para vacunar ratones (n = 4). La secuencia de la fusión de péptidos era

KDGGKYTLESHKELQ*EAAAKEAAAK***KDINKIYFMTDVDLGGPTFVLND** (SEC ID NO: 3) (Vacuna #4), donde el ligante aparece en letra cursiva y los diferentes epítopos están identificados en caracteres en negrita. Los epítopos eran KDGGKYTLESHKELQ (SEC ID NO: 1) codificado a partir de SACOL0442, KDINKIYFMTDVDL (SEC ID NO: 23) codificado a partir de SACOL0720, y DVDLGGPTFVLND (SEC ID NO: 24) también codificado de SACOL0720. Los anticuerpos IgG de los sueros obtenidos de los animales pudieron unirse a fragmentos de aminoácidos que comprendían epítopos de células B de SACOL0442 (es decir KDGGKYTLESHKELQ (SEC ID NO: 1)) y/o de SACOL0720 (es decir QFGFDLKHKKDALA (SEC ID NO: 21); KDINKIYFMTDVDL (SEC ID NO: 23), DVDLGGPTFVLND (SEC ID NO: 24)) en los ensayos ELISA con títulos de anticuerpos de 1/6400 o más. La fusión de péptidos utilizada para la inmunización y los fragmentos de aminoácidos o polipéptidos empleados como dianas de los anticuerpos en los ensayos ELISA están expuestos a continuación, en la Tabla III. En esta tabla, los epítopos están en negritas y la secuencia ligante aparece en cursiva.

Tabla III- Vacuna polipeptídica y dianas de respuesta a los anticuerpos

Fusión de péptidos utilizada para la vacunación
KDGGKYTLESHKELQ*EAAAKEAAAK***KDINKIYFMTDVDLGGPTFVLND** (SEC ID NO: 3)
Péptidos y polipéptidos diana unidos por IgG de ratones vacunados en un ensayo ELISA
KDGGKYTLESHKELQ*EAAAKEAAAK***KDINKIYFMTDVDLGGPTFVLND** (SEC ID NO: 3) (fusión de péptidos); GEHLPKGNIVINT**KDGGKYTLESHKELQ**KDRENVKINTAD (SEC ID NO: 2) (fragmento codificado por SACOL0442); **KDINKIYFMTDVDLGGPTFVLND**KDYERKYKKHIVS**QFGFDLKHKKDALA** (SEC ID NO: 27) (variante que comprende fragmentos codificados por SACOL0720) **SACOL0442** (SEC ID NO: 55) (es decir la versión de polihistidina expuesta en FIG. 21E, ítem II); **SACOL0720** (SEC ID NO: 25) (es decir la versión de polihistidina expuesta en FIG. 21D, ítem III);

[00206] Todas las dianas de los anticuerpos antes expuestas se unieron, en un ensayo ELISA, a la IgG de ratones vacunados con el antígeno de fusión expuesto.

[00207] Esto demuestra que se puede emplear una fusión de epítopos peptídicos codificados tanto por SACOL0442 como por SACOL0720 para inmunizar y provocar una respuesta inmune en un mamífero. La respuesta inmune obtenida incluye la producción de anticuerpos que reconocen SACOL0442 o SACOL0720, fragmentos de aminoácidos o variantes codificados a partir de SACOL0442 o de SACOL0720.

EJEMPLO 12: Una fusión de múltiples epítopos empleados como antígeno en las inmunizaciones potencia significativamente la respuesta inmune contra un epítopo individual – Vacuna #4

[00208] Se utilizó una fusión de epítopos peptídicos codificada a partir de SACOL0442 y SACOL0720 para vacunar ratones (n = 4). La secuencia de la fusión de péptidos era **KDGGKYTLESHKELQ***EAAAKEAAAK***KDINKIYFMTDVDLGGPTFVLND** (SEC ID NO: 3), en la cual el ligante aparece en letra cursiva y los diferentes epítopos están identificados en caracteres en negrita. Los epítopos eran KDGGKYTLESHKELQ (SEC ID NO: 1) codificado a partir de SACOL0442, KDINKIYFMTDVDL (SEC ID NO: 23) codificado a partir de SACOL0720 y DVDLGGPTFVLND (SEC ID NO: 24) también codificado por SACOL0720. Otro grupo de ratones (n = 4) fue inmunizado con el epítopo peptídico individual KDGGKYTLESHKELQ (SEC ID NO: 1), codificado a partir de SACOL0442.

[00209] Se recogieron sueros de los animales y se los analizó para determinar la presencia de anticuerpos IgG dirigidos a un fragmento de aminoácidos codificado de SACOL0442 (GEHLPKGNIVINT**KDGGKYTLESHKELQ**KDRENVKINTAD) (SEC ID NO: 2), que contiene el epítopo peptídico KDGGKYTLESHKELQ (SEC ID NO: 1).

[00210] Como se ilustra en la F**IG. 7**, la inmunización con la fusión de tres epítopos peptídicos (uno codificado a partir de SACOL0442 y dos codificados a partir de SACOL0720) aumentó significativamente la producción de anticuerpos contra un fragmento de aminoácidos codificado a partir de SACOL0442 (GEHLPKGNIVINT**KDGGKYTLESHKELQ**KDRENVKINTAD) (SEC ID NO: 2), que contiene el epítopo peptídico KDGGKYTLESHKELQ (SEC ID NO: 1), en comparación con el nivel de anticuerpos obtenido cuando sólo se utiliza el epítopo peptídico KDGGKYTLESHKELQ (SEC ID NO: 1) como antígeno para la inmunización.

EJEMPLO 13: Respuesta inmune contra un fragmento de polipéptido de 50 aminoácidos codificado por una variante de SACOL0720 -Vacuna #5

[00211] Se vacunó un grupo de ratones (n = 3) con un fragmento de péptido de 50 aminoácidos (**KDINKIYFMTDVDLGGPTFVLND**KDYERKYKKHIVS**QFGFDLKHKKDALA** (SEC ID NO: 27)) (Vacuna #5) que contenía epítopos de células B (caracteres en negrita) codificado a partir de la secuencia SACOL0720, más específicamente los epítopos KDINKIYFMTDVDL (SEC ID NO: 23), DVDLGGPTFVLND (SEC ID NO: 24) y QFGFDLKHKKDALA (SEC ID NO: 21). La secuencia total de **KDINKIYFMTDVDLGGPTFVLND**KDYERKYKKHIVS**QFGFDLKHKKDALA** (SEC ID NO: 27) varía con respecto a la secuencia nativa de SACOL0720 en cuatro aminoácidos en la región que liga los epítopos DVDLGGPTFVLND (SEC ID NO: 24) y QFGFDLKHKKDALA (SEC ID NO: 21). Por consiguiente, se puede considerar que la vacuna #5 es un fragmento variante de SACOL0720 o una fusión de epítopos de SACOL0720, que están espaciados por el ligante ERKYK (SEC ID NO: 61).

[00212] Se analizaron los sueros para determinar la presencia de anticuerpos IgG dirigidos a un fragmento de la proteína nativa codificada por SACOL0720 (SEC ID NO: 25) (es decir la versión de polihistidina expuesta en la FIG. 21D, ítem II). Ambos ratones vacunados con el fragmento peptídico que correspondía a la secuencia de aminoácidos variante (o fusión SACOL0720-720) produjeron anticuerpos que reconocieron los epítopos de la secuencia de aminoácidos original en un ensayo ELISA con títulos de 1/6400 o más.

[00213] Esto demuestra que un fragmento de aminoácidos que comprende los epítopos codificados a partir de la secuencia SACOL0720 puede provocar una respuesta inmune en un mamífero. Esto también demuestra que una variante de la secuencia nativa tiene la capacidad de estimular el sistema inmune contra la secuencia fragmentaria original que contiene epítopos de células B.

EJEMPLO 14 : Respuesta inmune contra una combinación de fusiones (fusión de péptidos 0442-0720 y fusión de polipéptidos 0029-1867) - Vacuna #6

[00214] Se combinó una fusión de epítopos peptídicos codificados a partir de SACOL0442 y SACOL0720 (ver la secuencia en la FIG. 21I, Ítem VII- fusiones) con una fusión de polipéptidos que contenía secuencias de SACOL0029 y SACOL1867 (ver la secuencia en la FIG. 21I, ítem VII fusiones) y se la utilizó para vacunar ratones (Vacuna #6).

[00215] Para la preparación de las dosis para la inmunización, se mezcló la fusión de péptidos 0442-0720 y la fusión de polipéptidos 1867-0029 y se suspendió la mezcla en PBS con contenido de 20 % del adyuvante, emulsión de aceite en agua EMULSIGEN®-D para obtener una dosis final de 100 µg y 5 µg por dosis de la fusión peptídica (0442-0720) y la fusión polipeptídica (0029-1867), respectivamente**.** Se inmunizaron ratones CD-1 hembra (n = 3) mediante tres inyecciones subcutáneas en el cuello. Las primeras dos inyecciones se realizaron con un intervalo de una semana y la tercera inyección 3 semanas después de la segunda. No se observaron efectos secundarios adversos durante la totalidad del período experimental. Se extrajeron muestras de sangre inmediatamente antes de la primera inyección preparatoria (sueros preinmunes) y catorce días después de la última inmunización de refuerzo (sueros inmunes). Se dejó que las alícuotas de sangre coagularan a temperatura ambiente durante una hora, y luego se las centrifugó a 10.000 g durante 10 min a 4°C. Se cosecharon los sueros y se los mantuvo a -20°C hasta el posterior análisis.

[00216] Los anticuerpos IgG de los sueros cosechados de los animales pudieron unirse a los fragmentos de aminoácidos que comprendían epítopos de SACOL0442 o SACOL0720 o al polipéptido SACOL0029 o SACOL1867 en ensayos ELISA con títulos de anticuerpos de 1/6400 o más. La fusión de péptidos y polipéptidos utilizada para la inmunización y los polipéptidos o fragmentos de aminoácidos usados como dianas de los anticuerpos en ensayos ELISA están expuestos en la siguiente **Tabla IV**.

Tabla IV- Vacuna de fusión polipeptídica mixta y dianas de respuesta al anticuerpo

Se utilizó una mezcla de la fusión de péptidos 0442-0720 y la fusión de polipéptidos 0029-1867 para la vacunación (Vacuna #6)

Los epítopos están en negrita y la secuencia ligante aparece en cursiva

0442-0720: **KDGGKYTLESHKELQ***EAAAKEAAAK***KDINKIYFMTDVDLGGPTFVLND** (SEC ID NO: 3)

0029-1867: SACOL0029-*GGGGSGGGGSGGGGS*-SACOL1867 (SEC ID NO: 55)

Péptidos y polipéptidos unidos por la IgG de ratones vacunados en un ensayo ELISA

GEHLPKGNIVINT**KDGGKYTLESHKELQ**KDRENVKINTAD (fragmento codificado por SACOL0442) (SEC ID NO: 2) (ver la secuencia en la FIG. 21I, Ítem VII- fusiones);

KDINKIYFMTDVDLGGPTFVLNDKDYERKYKKHIVS**QFGFDLKHKKDALA** (fragmento codificado por

SACOL0720) (SEC ID NO: 27) (ver la secuencia en la FIG. 21I, Ítem VII- fusiones);
SACOL1867 (SEC ID NO: 40) (ver la secuencia marcada con his en la FIG. 21F, Ítem IV);
SACOL0029 (SEC ID NO: 8) (ver la secuencia marcada con his en la FIG. 21A, Ítem I);

[00217] Esto demuestra que se puede utilizar una combinación de fusiones (*por ej.*, la fusión peptídica 0442-0720 mezclada con la fusión polipeptídica 0029-1867) para inmunizar y provocar una respuesta inmune en un mamífero. La respuesta inmune obtenida incluye la producción de anticuerpos que reconocen las secuencias de aminoácidos codificadas a partir de SACOL0442 o SACOL0720 o SACOL0029 o SACOL1867.

EJEMPLO 15: Materiales y Métodos para una mutante viva atenuada

[00218] *Cepas bacterianas y condiciones de cultivo*. Las cepas empleadas en los Ejemplos 15-25 están enumeradas en la Tabla V. *S. aureus* ATCC 29213 y su mutante isogénica Δ720 fueron descriptas anteriormente (Allard *et al*. 2013). Excepto si se expresa lo contrario, se cultivaron cepas de *S. aureus* en caldo tríptico de soja (TSB) y agar (TSA) (BD, ON, Canadá), y las *Escherichia coli* DH5α fueron cultivadas en medio LB y LBA (BD). Cuando resultó necesario, se agregó a las placas de agar ampicilina (100µg/ml) (Sigma, Oakville, Ontario, Canadá), cloranfenicol (20 µg/ml) (ICN Biomedicals, Irvine, CA) y eritromicina (10 µg/ml) (Sigma). Para los análisis inmunológicos, se seleccionaron cuatro aislados diferentes de mastitis bovina correspondientes a algunos de los tipos predominantes de *S. aureus spa* encontrados en los rebaños lecheros canadienses y de otras partes del mundo (Veh *et al*., 2015; Mitra *et al*., 2013). Se aisló la cepa SHY97-3906 (*spa* t529) de un caso de mastitis bovina clínica que tuvo lugar durante el período de lactancia, y originalmente se aisló CLJ08-3 (*spa* t359) de una vaca con mastitis persistente en el período de secado (Allard *et al*., 2013). Se obtuvieron las cepas Sa3151 (*spa* t13401) y Sa3181 (*spa* t267) de la Canadian Bovine Mastitis y Milk Quality Research Network (CBMMQRN) Mastitis Pathogen Culture Collection (Colección de Cultivos de Patógenos de Mastitis de la Red de Investigaciones sobre Mastitis Bovina y Calidad de la Leche Canadiense (CBMMQRN) (Université de Montréal, Faculté de médecine vétérinaire, St-Hyacinthe, QC, Canadá), y se las aisló de casos de infecciones intramamarias subclínicas.

Tabla V- Cepas y plásmidos usados en los Ejemplos 15-25

Cepa o plásmido	Detalles relevantes	Fuente o referencia
Cepas		
S. aureus		
RN4220	Derivada de 8325-4, aceptora de ADN extraño, r-	Kreiswirth *et al.* (1983)
ATCC29213	Tipo Salvaje, SACOL0720 (*vraG)* positiva, fenotipo normal	American Type Culture Collection
Δ720	SACOL0720 (*vraG*) mutante isogénica por inserción de transposones de ATCC29213	Allard *et al.* (2013)
Δ*hemB*	*hemB*::EM^r; mutante isogénica de ATCC29213, fenotipo VCP	Descripta en la presente
Δ720Δ*hemB*	*hemB*::EM^r; mutante isogénica de Δ720, fenotipo VCP	Descripta en la presente
E. coli		
SHY97-3906 (*spa* t529)		aislada de un caso de mastitis bovina clínica
CLJ08-3 (*spa* t359)		aislada de una vaca con mastitis persistente en la fase de secado
Sa3151 (*spa* t13401)		CBMMQRN) Colección de Cultivos de Patógenos de Mastitis
Sa3181 (*spa* t267)		CBMMQRN) Colección de Cultivos de

		Patógenos de Mastitis
DH5α	lacZDM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	Invitrogen (ON, Canadá)
Plásmidos		
pBT2	Vector transportador, sensible a la temperatura, AprCmr	Brückner (1997)
PBT-E	Derivada de pBT2, insertada en el cassette *ErmA*	Descripta en la presente
pBT-E*hemB*	Derivada de pBT2, para la deleción de *hemB*; $Ap^rCm^rEm^r$	Descripta en la presente

[00219] *Condiciones de cultivo celular*. Se utilizó un linaje de células epiteliales mamarias bovinas establecida (BMEC), MAC-T (Huynh *et al*., 1991), como modelo de infección en cultivo celular. Se cultivaron las células MAC-T de la manera habitual y se las mantuvo en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contenía 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (FBS), suplementado con 5µg/ml de insulina (Roche Diagnostics Inc., Laval, Canadá) y 1µg/ml de hidrocortisona (Sigma), y se lo incubó a 37°C en una incubadora humectada con 5% de CO_2. Los reactivos para el cultivo celular fueron adquiridos a Wisent (St-Bruno, QC, Canadá).

[00220] *Manipulaciones de ADN*. Se siguieron las recomendaciones de los fabricantes de kits para el aislamiento de ADN genómico (Sigma), el aislamiento de ADN plasmídico (Qiagen, ON, Canadá), la extracción de fragmentos de ADN de geles de agarosa (Qiagen) y la purificación de productos de la PCR y de fragmentos de ADN digeridos (Qiagen). Se utilizó un tratamiento adicional de 1 h con lisostafina (Sigma) a razón de 200 µg/ml para obtener una lisis eficiente de células de *S. aureus* en aislamientos de ADN genómico y plasmídico. Se diseñaron cebadores (IDT® Integrated DNA Technologies; Coraville, Iowa, USA) para agregar sitios de restricción al comienzo y final de los productos amplificados. Las PCRs se llevaron a cabo utilizando la DNA Polimerasa Taq (NEB, Pickering, ON, Canadá) para la PCR de rutina o la ADN Polimerasa de alta fidelidad Q5 (NEB) para la clonación, y se optimizaron los tiempos de ciclado para cada par de cebadores. Se

generaron constructos plasmídicos utilizando DH5α *E. coli* (Invitrogen, Burlington, ON, Canadá), enzimas de restricción (NEB), y la DNA ligasa T4 (NEB). Los constructos plasmídicos fueron convalidados por los patrones de digestión por restricción y la secuenciación de ADN antes de la electroporación en *S. aureus* RN4220 (Kreiswirth *et al.*, 1983) y en las cepas huésped finales. Los plásmidos utilizados en los Ejemplos 15-25 están enumerados en la anterior Tabla V.

[00221] *Generación de las cepas vivas atenuadas de S. aureus Δ720 y ΔhemB.* Se construyó una mutante isogénica *hemB* de la cepa 29213 de la ATCC, en la cual se detectó el gen *hemB* y se lo reemplazó por mediante la inserción de un cassette de *emrA* por recombinación homóloga. Se generó la mutante de *S. aureus* ATCC 29213 para el gen SACOL0720 (Δ720) utilizando el Sistema de Silenciamiento Génico TargeTron™ (con el Vector pNL9164 TargeTron™ (Sigma–Aldrich Canada Ltd.) (Chen et al., 2007) para la alteración de los genes bacterianos mediante la inserción de intrones del grupo II (fragmento de un tamaño de aprox. 2Kb que ya se ha descripto (Allard et al., 2013) entre los nucleótidos 803 y 804 de *S. aureus* ATCC29213. Se siguieron los protocolos y recomendaciones del fabricante.

[00222] *Generación de ΔhemBΔ720.* Para obtener una segunda mutación en el gen *hemB* a fin de obtener un fenotipo VCP en el trasfondo genético mutante Δ720, se utilizó otra estrategia: se utilizó pBT2-*hemB*:*emrA* termosensible (pBT-E:*hemB*) en una estrategia ya descripta (Mitchell et al., 2008), con algunas modificaciones. En pocas palabras, se construyó el plásmido pBT-E mediante la inserción de un cassette *ermA* entre los sitios XbaI y SalI del vector transportador termosensible pBT2 (Brückner, 1997). Se amplificaron las regiones flanqueantes de fragmentos de ADN del gen *hemB* (SACOL1715) de *S. aureus* ATCC 29213 y se los clonó a ambos lados del cassette *ermA* en el plásmido pBT-E. A continuación, se transfirió el plásmido para la propagación a *S. aureus* RN4220 (res-). Después de la lisis bacteriana con lisostafina (200 µg/ml durante 1 h a temperatura ambiente), se aisló el ADN plasmídico para transformar ATCC 29213 y Δ720 por electroporación. Para la integración del plásmido y la generación de mutantes, en primer lugar se cultivaron las bacterias de un día para otro a 30°C con 10 µg/ml de eritromicina y una suplementación de 1 µg/ml de hemina (Sigma-Aldrich, ON, Canadá). Seguidamente se diluyeron las bacterias 1:1000 y se las cultivó de un día para otro a 42°C con 2,5 µg/ml

de eritromicina y 1 μg/ml de hemina. Se repitió este paso dos veces. Por último, se diluyeron las bacterias 1:1000 y se las cultivó de un día para otro a 42°C sin antibióticos. Se seleccionaron mutantes con el gen *hemB* inactivado por ser resistente a la eritromicina y sensible al cloranfenicol, junto con un fenotipo SCV que se puede complementar (es decir, la reversión al fenotipo de cultivo normal) mediante un suplemento de 5 μg/ml de hemina en placas de agar. La deleción de *hemB* en las cepas ATCC 29213 (es decir, Δ*hemB*) y Δ720 (es decir, Δ*hemB*Δ720) fue confirmada por PCR (véanse las FIGs. 8A y B).

[00223] *Suplementación con hemina en el cultivo en caldo.* Para evaluar la capacidad de la hemina para restablecer la cinética de desarrollo óptima de S. aureus ΔhemB y la doble mutante Δ720ΔhemB, se diluyeron cultivos bacterianos de un día para otro a una $A_{600\ nm}$ de aproximadamente 0,1 en tubos de cultivo que contenían BHI fresco suplementado con hemina agregada en diversas concentraciones. Se monitoreó la A_{600nm} de los cultivos en diferentes puntos de tiempo durante el período de incubación a 35°C (225 rpm).

[00224] Infección por *S. aureus* de células epiteliales mamarias bovinas *(BMECs)*. Se utilizaron BMECs MAC-T para la caracterización de la infectividad intracelular y la persistencia de ATCC 29213 (WT (tipo salvaje)) y sus mutantes isogénicas. Cuarenta y ocho horas antes de la infección, se sembraron $1x10^5$/ml de células MAC-T en placas de 24 pocillos tratadas (Corning) para obtener 30 % de confluencia. Se cultivaron monocapas hasta la confluencia bajo 10% de CO_2 a 37°C. Seis horas antes de la infección, se lavaron las monocapas con DMEM y se las incubó con medio de invasión (IM) medio de cultivo sin antibióticos con contenido de FBS termo inactivado al 1%). Se diluyeron cultivos bacterianos realizados de un día para otro 1:20 en TSB fresco y se los cultivó hasta la fase de desarrollo medio–logarítmica, luego se los lavó con PBS y se los diluyó en IM a una multiplicidad de infección de 10. La invasión se realizó incubando monocapas con bacterias por espacio de 3 h. A continuación se lavaron las monocapas con DMEM y se las incubó con IM que contenía 20 μg/ml de lisostafina para matar las bacterias extracelulares. El uso de lisostafina para matar las *S. aureus* normales y SCV ya había sido convalidado en ensayos de invasión celular (Moisan *et al*., 2006 y Tuchscherr *et al*, 2011). Se dejó actuar el tratamiento durante 30 30 min para determinar las UFCs a las 3h de infección, o durante 12 o 24 h más. Seguidamente, después de un exhaustivo lavado

con Solución Salina con Buffer de Fosfato (DPBS), se desprendieron las monocapas con tripsinización y se las sometió a lisis con Triton X-100 al 0,05% y se agregó PBS para obtener una concentración final de 1X. Se diluyó el lisado en serie y se lo cultivó en TSA para la determinación de UFCs.

[00225] *Ensayos de viabilidad y actividad metabólica de las BMECs*. Para determinar el daño citotóxico infligido por *S. aureus* ATCC 29213 (WT) y sus mutantes isogénicas a las células MAC–T, se llevó a cabo el ensayo de actividad metabólica celular MTT que mide la reducción de bromuro de 3–[4,5–dimetiltiazol–2–il]–2,5 difenil tetrazolio (MTT) para formar un producto de formazán insoluble en las células viables. El ensayo siguió el método de Kubica *et al*. (Kubica *et al*, 2008) con algunas modificaciones. En pocas palabras, se obtuvo la infección por *S. aureus* de las células de acuerdo con lo descripto con respecto al ensayo de persistencia, aunque en lugar de lisis después de 12 h o 24 h, se incubaron las células con 100 µl del reactivo MTT (5 mg/ml) (Sigma) en DPBS por espacio de 2 h a 37 °C. Después de esto, se agregó una solución solvente ácida de SDS al 16 % y PMF al 40 %, pH 4,7, para lisar las células y solubilizar los cristales de formazán de un día para otro. Se leyeron las muestras utilizando un lector de microplacas Epoch (Biotek Instruments Inc.) a una longitud de onda de 570 nm. Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado y pocillos control con células no infectadas (control de alta viabilidad) o se incluyeron células infectadas WT sometidas a lisis (control básico con bacterias, tratadas con % triton X–100 al 0,05 durante 10 min antes de la adición de MTT) en cada placa. Se calculó el nivel de actividad metabólica utilizando la siguiente fórmula:

[00226] (absorbancia de la muestra – control básico) / control elevado) ×100.

[00227] *Virulencia en el modelo de mastitis de ratón*. El modelo de infección de mastitis de ratón se basa en el descripto anteriormente (Brouillette, 2005; Brouillette, 2004). Todos los experimentos realizados con ratones fueron aprobados por el comité de ética sobre experimentación con animales de la Faculté des sciences of the Université de Sherbrooke y se llevaron a cabo de acuerdo con los lineamientos del Consejo Canadiense sobre Protección Animal (Canadian Council on Animal Care). En pocas palabras, una hora después de la separación de los vástagos de 12–14 días de edad, los ratones CD–1 en etapa de lactancia (Charles River Laboratories) fueron anestesiadas con ketamina y xilazina a razón de 87 y 13 mg/kg de peso corporal, respectivamente, y las glándulas

mamarias fueron inoculadas bajo un binocular. Se expusieron los ductos mamarios mediante un pequeño corte en los extremos proximales de los pezones y se inyectó una suspensión bacteriana de 100 μl que contenía 10^2 UFCs en salina con búfer de fosfato sin endotoxinas (PBS, Sigma) a través del canal del pezón utilizando una aguja roma de calibre 32. Se inocularon dos glándulas (cuarta de la derecha [R4] y cuarta de la izquierda [L4] de cabeza a rabo) por cada animal. Se cosecharon las glándulas mamarias de manera aséptica en los momentos estipulados, se las pesó y evaluó visualmente para comprobar la inflamación. Se evaluó la carga bacteriana después de la homogeneización mecánica de los tejidos en PBS, las diluciones en serie y el cultivo en agar para la determinación de UFC. En un segundo experimento, se conservaron glándulas homogeneizadas para la extracción de proteínas para ensayos enzimáticos de actividad de mieloperoxidasa (MPO).

[00228] *Extracción de proteínas de las glándulas mamarias*. Se realizó la extracción total de proteínas de las glándulas mamarias mediante un método optimizado que ya había sido descripto (Pulli *et al*., 2013), con algunas modificaciones. Se homogeneizaron los tejidos mamarios en un búfer que contenía una concentración final de fosfato de potasio de 50 mM, pH 6,0, y bromuro de hexadecil trimetilamonio (CTAB) 50 mM (Sigma). A continuación, las muestras fueron sometidas a ultrasonido, congeladas en nitrógeno líquido y descongeladas y centrifugadas a 2000 g durante 15 min a 4°C. Por último, se separó la capa grasa por aspiración y se guardaron los sobrenadantes para una centrifugación final de 15 min a 15.000 g, para descartar todo desecho celular. Se distribuyeron los sobrenadantes en alícuotas y se los mantuvo a -80 ° C hasta su uso para los ensayos enzimáticos o determinación de concentración de proteína medida por el kit de Análisis de Proteínas del método de ácido bicinconínico (BCA) (Thermo-Scientific).

[00229] *Ensayo de actividad de MPO*. Se midió el reclutamiento de neutrófilos en los tejidos mamarios mediante la cuantificación de la actividad de la enzima MPO por el método de la *o*–dianisidina–H_2O_2, modificado para microplacas (Bradley, RD. y Rothstein, GPPC., 1982). En una microplaca de 96 pocillos, se incubaron 10 μl de sobrenadantes de la extracción de tejidos con una solución de clorhidrato de o–dianisidina (0,167 mg/ml) (Sigma) y 0,0005% de H_2O_2 (Sigma) en búfer de fosfato 50 mM CTAB 50 mM, pH 6,0. Se midió cinéticamente la actividad de MPO a intervalos de 15 s durante un período de 5 min

en un lector de microplacas Epoch a 460 nm. Se considera una unidad de MPO como la cantidad de enzima que degrada 1 µmol de H_2O_2/min a 25°C, suponiendo un coeficiente de absorción de 11.3 mM^{-1} cm^{-1} a 460 nm en el caso de la o–dianisidina (Zhang *et al*., 2004). Los resultados se expresan en términos de unidades de MPO por g de glándula.

[00230] *Inmunizaciones de ratones con la mutante atenuada viva Δ720ΔhemB.* Se evaluaron las propiedades inmunogénicas de la cepa atenuada Δ*720*Δ*hemB* administrada en forma de vacuna viva en ratones. En estudios preliminares, los ratones toleraron bien las inyecciones intramusculares y subcutáneas (SC) de la cepa atenuada. Se seleccionaron las dosis de 10^6, 10^7 y 10^8 UFCs y la vía SC para los experimentos subsiguientes. Para la preparación del inóculo bacteriana, se lavaron colonias de Δ*720*Δ*hemB de S. aureus* previamente cultivadas en placas de BHIA dos veces en PBS helado y se las suspendió en PBS con contenido de 15% de glicerol, luego se las dividió en alícuotas y se las mantuvo a -80 °C hasta su eventual uso. Se comprobaron los recuentos bacterianos viables en la preparación de inóculo mediante dilución en serie y cultivo en placas de BHIA. Los ratones CD-1 fueron divididos de manera aleatoria en 3 grupos: el grupo 1 (n=3) recibió una dosis de 10^6 UFCs; el grupo 2 (n=3), 10^7 UFCs y el grupo 3 (n=3), 10^8 UFCs. Los ratones fueron inmunizados mediante dos inyecciones subcutáneas de bacterias en PBS (100 µl), en el cuello, con un intervalo de dos semanas. Se extrajeron muestras de sangre inmediatamente antes de la inyección preparatoria (sueros preinmunes) y diez días después de la inmunización de refuerzo (sueros inmunes). Se dejó que las alícuotas de sangre coagularan a temperatura ambiente durante una hora y luego se las centrifugó a 10,000 g durante 10 min a 4 °C. Se colectaron los sueros y se los mantuvo a -20 °C hasta el posterior análisis.

[00231] *Preparación de extractos celulares de S. aureus*. La preparación de extractos de células enteras de *S. aureus* se llevó a cabo de la manera descripta anteriormente con algunas modificaciones (Asli *et al*., 2016). En pocas palabras, se diluyeron cultivos bacterianos de un día para otro 1/1000 en caldo fresco BHI, y luego se los incubó a 35 °C (225 rpm) hasta alcanzar una A600nm de ~ 0,8. Se centrifugaron las células bacterianas y se lavaron los pellets dos veces en PBS helado y se las suspendió con la adición de 5 ml de PBS por ml de pellet. En primer lugar se trataron las suspensiones bacterianas con lisostafina (Sigma) (100 µg/ml de pellet) por espacio de 1 h a 37°C, y luego se agregaron

a la suspensión 3 µg de coctel de inhibidores de la proteasa (Sigma), 8 µg de RNAsa A (Sigma) y 8 µg de DNAsa (Qiagen) por ml de pellet. Después de 30 min a temperatura ambiente, se produjo mecánicamente la ruptura de las células mediante 3 a 4 pasadas en por un disruptor celular SLM Aminco™ French Pressure, y luego se las centrifugó a 12.000 × g y 4 °C durante 10 min para separar las células que no se rompieron. Se recogió el sobrenadante y se determinó la concentración total de proteínas de la manera antes descripta con el Kit de Análisis de Proteínas BCA.

[00232] *Detección de IgG total de ratón por ELISA*. Se realizó la detección de IgG total en suero contra la cepa de la vacunación *Δ720ΔhemB* y cada uno de los aislados de IMI bovina para demostrar y medir la respuesta humoral sistémica generada por la inmunización de los ratones. Para los antígenos diana, se revistieron placas de 96 pocillos Nunc MaxiSorp™ (Thermo Fisher Scientific Inc., Rochester, NY) con 100 µl de cada uno de los extractos de células enteras de *S. aureus* (10 µg/ml diluidos en búfer de carbonato/bicarbonato, Sigma), y se los incubó de un día para otro a temperatura ambiente. A continuación, se saturaron las placas con PBS con contenido de 5% de leche descremada en polvo durante 1 h a 37°C, a lo que siguió un segundo paso de bloqueo con la adición de suero porcino al 5% para impedir las interacciones no específicas de la proteína A de *S. aureus*. Se cargaron cien microlitros de diluciones dobles en serie de los sueros en búfer de dilución (PBS con 2% de leche, 5% de suero porcino y 0,025% de Tween™ 20) en las placas y se las incubó durante 1 h a 37°C. A continuación, las placas fueron lavadas tres veces con PBS con contenido de 0,05% de Tween™ 20 y se las cargó con 100 µl de IgG anti–ratón de cabra conjugada a peroxidasa de rábano (HRP) (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA) diluida 1/5000 en el búfer de dilución. Al cabo de 1 h de incubación a 37°C seguida por 3 lavados, se detectó la actividad de peroxidasa con el reactivo 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (KPL Inc., Gaithersburg, MD) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

[00233] *Análisis estadístico*. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software GraphPad Prism™ (v.6.02). Se transformaron las UFCs intracelulares bacterianas y las UFCs bacterianas/g de glándula (IIM en ratones) en valores logarítmicos con base 10 antes de utilizarlas para los análisis estadísticos. Las pruebas estadísticas empleadas para el análisis de cada experimento y la significancia están especificadas en las leyendas

de las figuras.

EJEMPLO 16: Construcción de cepa *S. aureus* ATCC 29213 Δ720, Δ*hemB* y Δ720Δ*hemB*

[00234] Los organismos vivos atenuados que imitan la infección natural estimulan el sistema inmune en forma poderosa, provocando respuestas inmunes amplias y fuertes que producen anticuerpos tanto séricos como de la mucosa, y células T efectoras y de la memoria las cuales actúan sinérgicamente para proteger contra enfermedades (Detmer, 2006; Kollaritsch, 2000; Pasetti, 2011).

[00235] Se demostró que una mutación en el gen SACOL0720 altera la virulencia de *S. aureus* en las infecciones IIM experimentales en la vaca (Allard et al., 2013).

[00236] Se prepararon cepas atenuadas vivas adicionales para utilizar en la vacuna sobre la base de los aspectos fenotípicos de VCP de *S. aureus*. Las VCP no generan generalmente infecciones invasivas (es decir, atenuación adicional) y se pueden internalizar en células huéspedes y, por lo tanto, estimularán la respuesta inmunológica mediada por células además de la respuesta inmunológica humoral.

[00237] En primer lugar, se creó una VCP de *S. aureus* estable a través de la deleción del gen *hemB* (Δ*hemB*) (véase el Ejemplo 15, *Generation of live attenuated S. aureus strain Δ720 and ΔhemB*). Luego se logró la atenuación adicional de esta VCP mediante la inactivación del gen SACOL0720 (Δ720) (véase el Ejemplo 15, *Generation of* Δ*hemB*Δ720).

[00238] Después de la infección de células epiteliales mamarias bovinas MAC-T, el doble mutante (Δ720Δ*hemB*) mostró significativamente una internalización y destrucción celular inferiores en comparación con lo observado con Δ*hemB* y Δ720, respectivamente.

EJEMPLO 17: Cepa *S. aureus* Δ*hemB*Δ720 es atenuada en células MAC-T

[00239] Luego se comparó la infectividad de ATCC 29213 (WT), las cepas Δ720, Δ*hemB* y Δ*hemB*Δ720 en ensayos de persistencia intracelulares utilizando células MAC-T. Mediante la comparación de las tres cepas mutantes con su progenitor del tipo salvaje isogénico, se observaron distintos efectos de mutaciones en genes *hemB* y SACOL0720. Una incubación corta de 3 horas de las bacterias con monocapas celulares seguida por la

adición de lisostafina para eliminar las bacterias extracelulares demostró altos niveles de internalización en células MAC-T tanto para las cepas WT como para Δ*hemB*, en función de la recuperación de bacterias intracelulares viables (UFC) (FIGs. 9A y B). Sin embargo, el mutante Δ720 único mostró una internalización menos significativa ($P \leq 0.01$) en comparación con su cepa WT (del tipo salvaje) parenteral (FIG. 9A). La reducción en la internalización observada en Δ720 era aún más pronunciada cuando se compara el doble mutante Δ*hemB*Δ720 con Δ*hemB*, con diez veces de reducción de la recuperación del inóculo en este ensayo de internalización de 3 h ($P \leq 0.001$, FIG. 9B). Esta reducción inicial de la carga bacteriana internalizada era aún evidente 12 y 24 h pos-invasión (PI) para la cepa doble mutante Δ*hemB*Δ720 (FIG. 9C), según lo ilustrado por la reducción de 1-$\log^{10}$ de UFC/ml en ambos puntos de tiempo en comparación con lo observado para Δ*hemB* ($P \leq 0.001$). La diferencia en las cargas bacterianas intracelulares iniciales entre las cepas mutante Δ720 y WT (FIG. 9A) desapareció gradualmente con tiempos más largos de incubación (FIG. 9C), ya que ambas cepas no persistieron bien en células MAC-T (FIG. 10). Por el contrario, las UFC intracelulares recuperadas para la cepa Δ*hemB* única eran significativamente superiores en comparación con lo que se recuperó para las tres otras cepas a 24 h PI (FIG. 9C, $P \leq 0.001$ contra todo). En general y según lo esperado para el fenotipo de VCP, la cepa Δ*hemB* mostró una persistencia intracelular superior que cualquier otra cepa con el transcurso del tiempo (FIG. 10). Estos resultados sugieren que la mutación Δ720 reduce principalmente el proceso de internalización en células MAC-T. Los resultados demuestran adicionalmente que el mutante Δ*hemB*Δ720 es aún capaz de internalización y persistencia en BMECs aunque en un grado mucho más bajo que lo observado con el mutante único Δ*hemB*.

[00240] Las VCP *ΔhemBΔ720 y ΔhemB* causan una disrupción baja de BMEC. Según lo informado con anterioridad en esta invención, las cepas de VCP Δ*hemB* y *ΔhemBΔ720* mostraron una persistencia mayor con el transcurso del tiempo en células MAC-T, según lo ilustrado por su viabilidad sostenida a 12 y 24 h PI en comparación con las cepas WT y Δ720 (FIGs. 9C y 10). El porcentaje del inóculo recuperado de las células permaneció casi igual de 0 a 24 h después de la adición de lisostafina, tanto para los mutantes *hemB* dobles como simples, con un ligero aumento a 12 h, lo cual indica el crecimiento intracelular (FIG. 10). Ambas cepas comenzaron a disminuir a una velocidad lenta

después de este tiempo de infección. Sin embargo, la reducción aparente de UFC intracelulares para las cepas WT y Δ720 era concomitante con la observación visual del daño en aumento a las monocapas celulares con el transcurso del tiempo, en comparación con lo observado con cepas de los fenotipos de VCP.

[00241] *Se evaluó además la viabilidad de las células MAC-T después de la infección por cada una de las cuatro cepas estudiadas.* se evaluó la viabilidad de las células MAC-T mediante el método MTT (Kubica et al., 2008). Los resultados muestran que ambas cepas de VCP (Δ*hemB* y Δ*hemB*Δ720) causaron una eliminación de MAC-T significativamente menor en este ensayo en contraste con las cepas WT y Δ720. Cuando se compara con Δ*hemB*, la cepa WT casi redujo a la mitad la viabilidad de células a 12 h (FIG. 11A: WT: 25.4 %; Δ*hemB*: 48.4%). Esta diferencia era todavía evidente a 24 h (FIG. 11B: 16.3% vs. 34.5 %, respectivamente), aún si la carga bacteriana era 10 veces superior para la cepa mutante Δ*hemB* (FIG. 9C). Las células MAC-T fueron más dañadas por Δ*hemB* que por el doble mutante Δ720Δ*hemB* aunque la diferencia fue solamente significativa a 24 h ($P \leq 0.01$). Cuando se compara directamente con la cepa WT, el doble mutante Δ720Δ*hemB* sostuvo la viabilidad de las células epiteliales 2,3 veces más a 12 h (FIG. 11A) y 2,7 veces más a 24 h (FIG. 11B) (12 y 24 h: $P \leq 0.0001$). Por lo tanto, la mayor persistencia intracelular de ambas cepas de VCP en comparación con las cepas WT y Δ720 con el transcurso del tiempo (FIG. 10) fue atribuida probablemente a una toxicidad más baja de las VCP a células MAC-T (FIG. 11). En su conjunto, los resultados de los ensayos de infección de BMEC proporcionaron evidencia de un efecto aditivo de ambas mutaciones Δ*hemB* y Δ720 para la atenuación de la cepa WT.

EJEMPLO 18: Cepa *S. aureus* Δ*hemB*Δ720 es atenuada en un modelo de IIM de ratón

[00242] Para evaluar la atenuación de Δ*hemB*Δ720 en un modelo *in vivo* de infección, se evaluó la virulencia del mutante doble y se comparó con la cepa WT en un modelo de IIM murino (Brouillette y Malouin, 2005). Para ambas cepas, la fase exponencial de infección tuvo lugar principalmente dentro de las primeras 12 h posinfección, mientras que la carga bacteriana máxima se alcanzó a 24 h para el mutante doble y 48 h (día 2 [D2]) para la cepa WT (FIG. 12). A las 24 h, el mutante doble mostró una reducción de 1.9 $\log^{10}$ en UFC/g media de glándula en comparación con WT ($P \leq 0.05$). También después de 24 h,

la carga bacteriana del mutante mostró una disminución constante hasta que se alcanzó un aclaramiento bacteriano completo en el día 12 (mostrado por el asterisco en la FIG. 12). En contraste, la cepa tipo salvaje WT parental provocó severas infecciones invasivas en comparación con el mutante, matando a 3 de 9 ratones remanentes en el día 2 y 2 de 3 ratones en el día 7 (FIG. 12; flechas) antes de que pudieran recolectarse las glándulas para esos grupos. Los ratones sobrevivientes a la infección con WT mantuvieron recuentos viables elevados (9 $\log^{10}$ UFC/g de glándula) en el día 7, una diferencia aproximada de 5 $\log^{10}$ en la carga bacteriana en comparación con el mutante doble. Estos resultados demuestran claramente una capacidad marcadamente reducida de la cepa Δ*hemB*Δ720 para multiplicarse y sobrevivir en la glándula mamaria. Por lo tanto, el mutante doble Δ*hemB*Δ720 es fuertemente atenuado en un modelo de infección intramamaria (IIM) de ratón y es aclarado eficazmente de las glándulas mamarias.

[00243] La cepa atenuada Δ*hemB*Δ720 parece ser ideal para propósitos de vacunación y para la administración intracelular de antígenos. De hecho, la internalización baja y temporaria de Δ*hemB*Δ720 debería ayudar a la estimulación de la inmunidad mediada por células, un componente de la respuesta inmune que es importante para la defensa contra *S. aureus* (Fowler y Proctor, 2014).

EJEMPLO 19: Respuesta inflamatoria a cepas Δ720Δ*hemB* y WT luego de IIM

[00244] Para monitorear la respuesta inflamatoria (respuesta inmune) de los ratones a infecciones con cepas WT y mutantes, se evaluó la infiltración de neutrófilos en las glándulas mediante la actividad enzimática de MPO de extractos de proteína total de homogenados de glándula. La actividad de MPO en muestras biológicas ha sido previamente fuertemente correlacionada con el número absoluto de neutrófilos (Xia, 1997), y es por lo tanto un marcador adecuado. Durante las primeras horas después de la infección, el reclutamiento de neutrófilos siguió perfiles similares para el mutante doble y las glándulas infectadas con WT (FIG. 13), coincidiendo la intensificación exponencial de la infiltración de neutrófilos aparente desde 12 h hasta 24 h posinfección con el crecimiento bacteriano aunque con un cierto retraso. Se ha demostrado previamente que los números absolutos de células polimorfonucleares en relación con la carga bacteriana en glándulas mamarias no siempre alcanza el valor máximo al mismo tiempo (Brouillette, 2005). No pudo observarse ninguna diferencia significativa en la actividad de MPO a 6, 12

y 24 h entre las glándulas infectadas por cepas mutantes y tipo salvaje (FIG. 13). Sin embargo, esta equivalencia en la infiltración de neutrófilos aparente no se correlacionaba con la observación visual de la inflamación a 24 h, en cuyo momento la infección con WT generó un enrojecimiento extenso de las glándulas infectadas en comparación con el mutante doble (fotografías de la FIG. 14). Por el contrario, las glándulas infectadas con mutantes no fueron visualmente alteradas a nivel macroscópico en comparación con los controles con PBS. La disparidad entre la evaluación visual de la inflamación y los resultados de la infiltración de neutrófilos pudo ser atribuida a las diferencias en las cargas bacterianas (FIGs. 9A-C) y la actividad citotóxica de la cepa del tipo salvaje (FIG. 11), y pudo ser coherente con la capacidad altamente invasiva y diseminante de la cepa mediante la expresión de toxinas y enzimas. Por consiguiente, estos resultados indican que el reclutamiento de neutrófilos en las glándulas infectadas por la cepa mutante era equivalente a lo observado con la cepa del tipo salvaje WT y que esto era suficiente para permitir una disminución subsiguiente y aclaramiento de las cargas bacterianas del mutante.

[00245] Finalmente, para confirmar la seguridad de las cepas, y para evaluar que esta respuesta inflamatoria no fuese consecuente a una cepa reactogénica inadmisible, se monitoreó la actividad de MPO en glándulas infectadas con Δ720Δ*hemB* 4 y 12 días después de la infección. Luego, se comparó el nivel de actividad con los niveles obtenidos con ratones inyectados con PBS. Según lo ilustrado en la FIG. 15, la presencia de neutrófilos aparente en glándulas infectadas con mutantes era aún elevada 4 días después de la infección, oscilando la actividad de MPO entre 8 y 21 Unidades/g de glándula. Además, la involución glandular, el proceso mediante el cual la glándula lactante regresa a un estado casi previo al embarazo morfológicamente, es asociada comúnmente con el reclutamiento neutrofílico que posibilita la fagocitosis de células apoptóticas durante el remodelado de tejido (Stein, 2007). En los días siguientes a la infección en este modelo, las glándulas de los ratones ya se encuentran en ese estado normal de modificación, según lo indicado por su rápido encogimiento. Sin embargo, los niveles de MPO en glándulas infectadas con mutante pasaron por una declinación sustancial entre el día 4 y 12, ($P \leq 0.01$). Los niveles de MPO fueron luego considerados como estando nuevamente en un nivel normal en el día 12 sin mostrar una diferencia significativa a lo obtenido con

los ratones a los que se le ha inyectado PBS. La respuesta inflamatoria de las glándulas infectadas con Δ720Δ*hemB* vuelve a los niveles normales con el aclaramiento bacteriano (FIG. 15).

EJEMPLO 20: Inmunización con Δ*720G*Δ*hemB* genera una respuesta humoral fuerte contra diversos aislados de infección intramamaria bovina de *S. aureus*.

[00246] Para confirmar que la inmunización con la cepa Δ720Δ*hemB* viva pudiera de hecho generar una respuesta inmune fuerte adecuada para su uso como una vacuna viva putativa contra las infecciones intramamarias causadas por *S. aureus*, los ratones fueron inmunizados con diferentes dosis de la vacuna viva y se ensayaron IgG totales séricas para determinar la unión a extractos de células enteras de una variedad de aislados bovinos de *S. aureus*. En primer lugar, las dosis de 10^6, 10^7 y 10^8 UFC, administradas por vía subcutánea en el cuello, no activaron efecto adverso alguno tal como la modificación del comportamiento de los ratones o signos de inflamación o necrosis en el sitio de la inmunización a lo largo de todo el período de inmunización. Por añadidura, la inmunización utilizando cantidades en aumento del mutante doble vivo ATCC 29213 Δ*720*Δ*hemB* proporcionó títulos en aumento de anticuerpos de IgG sistémicos contra un extracto de células enteras de sus propios antígenos (FIG. 15B). Los títulos de los sueros inmunes eran significativamente superiores a aquellos de los sueros preinmunes, lo cual demuestra especificidad de la producción de anticuerpos contra antígenos de *S. aureus* presentes en la vacuna viva. Más importantemente, la inmunización con el empleo de cantidades en aumento de Δ*720*Δ*hemB* también proporcionó una suba consecuente de los títulos de anticuerpos contra diversas cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovina, incluyendo cepas de los tipos *spa* mayores encontrados en Canadá y en otras partes del mundo (FIG. 15C). Estos resultados muestran claramente que (i) la inmunización con el mutante doble puede provocar una respuesta inmune, y que (ii) el trasfondo de la cepa (ATCC 29213) comparten características en común suficientes con las cepas de mastitis bovina de tal modo que la respuesta de los anticuerpos también reconoce fuertemente cepas de tipos *spa* mayores.

[00247] La inmunización de ratones utilizando inyecciones subcutáneas de la cepa Δ*720*Δ*hemB* viva activó una respuesta humoral fuerte según lo juzgado por los elevados títulos de IgG total medida contra un extracto de células bacterianas enteras. Además, la

cepa de la vacunan Δ*720*Δ*hemB* tenía características comunes suficientes con cepas de mastitis bovina de tal modo que la respuesta a los anticuerpos también reconoció fuertemente cepas de una variedad de tipos *spa* asociados a la mastitis común.

[00248] Si bien esto demostró que la base del mutante doble (ATCC 29213) comparte muchas características comunes con las cepas de mastitis bovina, un mutante doble de ese tipo puede ser creado en cualquier base genética deseada si uno lo desea, notablemente en cualquier cepa que fue aislada de mastitis bovina, tal como, entre otras, la cepa de *S. aureus* RF122.

[00249] Estos resultados muestran que una cepa de VCP que tiene ciertas capacidades intracelulares residuales puede posibilitar el reclutamiento de células inmunes sin establecer una infección severa. Una cepa de VCP de ese tipo puede actuar como una vacuna atenuada viva que estimula adecuadamente la respuesta inmune para combatir patógenos con capacidades intracelulares.

EJEMPLO 21: Material y métodos - SACOL0442, SACOL0720, SACOL0029 y una fusión entre SACOL1867 y SACOL0029 + bacterias vivas atenuadas (vacuna #7)

[00250] *Producción de los antígenos*. Se llevó a cabo la producción de antígenos según lo descrito en el Ejemplo 6, en la sección *producción de los antígenos* excepto por la presencia adicional del antígeno SACOL0029. Proteínas recombinantes etiquetadas con His de SACOL0029 fueron construidas por ingeniería genética y fueron producidas por GenScript, Inc. (Piscataway, NJ). (véase FIGs. 21A, punto I, secuencia his-etiquetada).

[00251] *Generación de cepa de S. aureus Δ720ΔhemB atenuada viva.* Se realizó la generación de la cepa de *S. aureus* atenuada viva según lo descrito en el Ejemplo 15 (*Generación de* Δ*hemB*Δ720*)*.

[00252] *Inmunización de ratones.* Se evaluaron en ratones las propiedades inmunogénicas de proteínas de S. aureus recombinantes codificadas por los genes SACOL0442, SACOL0720, SACOL0029 y una fusión de genes SACOL0029 y SACOL1867 en combinación, o no, con la cepa bacteriana atenuada viva *S. aureus* Δ720Δ*hemB*. Los ratones toleraron bien una dosis de 10^3, 10^5, 10^6, 10^7 y 10^8 UFC mediante inyecciones subcutáneas en el cuello e inyecciones intramusculares en el cuarto. Se seleccionaron la dosis de 10^5 y la vía subcutánea para los siguientes experimentos.

[00253] Para la preparación de inóculo bacteriano, se lavaron dos veces colonias de *S. aureus* Δ720Δ*hemB* previamente cultivadas en placas BHIA en PBS enfriada con hielo y resuspendida en PBS que contiene 15% glicerol, luego se separaron en alícuotas y se mantuvieron a -80°C hasta el uso posterior. Para obtener la dosis final de inmunización de ratones, correspondiente a 10^5 UFC de bacterias atenuadas, se evaluó la concentración bacteriana de inóculo congelado mediante plaqueo con dilución seriada sobre BHIA y luego se diluyó hasta una concentración final de 10^5 UFC/ml en PBS en el día de la inmunización.

[00254] Para la preparación de dosis de proteína, se mezclaron SACOL0029, SACOL0442, SACOL0720, y el polipéptido de fusión SACOL0029-1867 y se suspendieron en PBS para obtener una dosis final de 5 µg de cada uno. Se dividieron aleatoriamente ratones hembra CD-1 en 3 grupos: el grupo 1 (5 ratones) recibió una dosis de proteína mixta (Mezcla proteica); el grupo 2 (5 ratones) recibió una dosis de bacteria atenuada (Δ720Δ*hemB*) (Δ720Δ*hemB*); el grupo 3 (6 ratones) recibió una combinación de proteínas mixtas y bacterias atenuadas (combinación). Se inmunizaron ratones hembra CD-1 mediante dos inyecciones subcutáneas en el cuello con una separación de dos semanas. Se diluyeron las dosis de proteínas y cepas bacterianas en PBS según lo descrito previamente y se administraron en un volumen final de 100 µl para cada grupo de ratones. No se observó efecto colateral adverso alguno durante la totalidad del período de inmunización experimental. Se extrajeron muestras de sangre justo antes de la primera inyección de cebadura (sueros preinmunes) y diez días después de la inmunización de refuerzo (sueros inmunes). Las alícuotas de sangre se dejaron coagular a temperatura ambiente durante una hora, se centrifugaron a 10.000 g durante 10 min a 4°C. Se recolectaron los sueros y se mantuvieron a -20°C hasta el posterior análisis.

[00255] *Detección de IgG, IgG1 e IgG2 total mediante ELISA*. La detección de IgG, IgG1 e IgG2 total en suero contra cada uno de los antígenos utilizados previamente para la inmunización se llevó a cabo según lo descrito con anterioridad con algunas modificaciones (Ster et al., *Vet. Immunol. Immunopathol.* (2010), 136: 311-318). Adicionalmente, se llevó a cabo la detección de IgG contra proteína superficial estafilocócica ClfA para demostrar las ventajas complementarias del uso de una cepa viva para aumentar y equilibrar la respuesta inmune contra *S. aureus*. Se recubrieron placas de

96 pocillos Nunc MaxiSorp™ (Thermo Fisher Scientific Inc., Rochester, NY) con 75 µl de cada uno de los antígenos del ensayo (6,67 µg/mL diluidos en buffer de carbonato/bicarbonato, Sigma Aldrich, Oakville, ON) y se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente. Luego, se saturaron las placas con PBS que contenía 5% de leche en polvo descremada durante 1 h a 37°C. Se cargaron cien microlitros de diluciones seriadas al ¼ de los sueros en PBS que contenía 3% de leche y 0,025% de Tween™ 20 en las placas y se incubaron durante 1 h a 37°C. Se lavaron las placas tres veces con PBS que contenía 0,05% de Tween™ 20. Luego se agregaron a la placa cien microlitros de anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP, por sus siglas en inglés). Los anticuerpos secundarios empleados eran una IgG de cabra anti-ratón, IgG2a e IgG1 (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA), diluidas 1/5000 respectivamente en PBS que contenía 3% de leche y 0,025% de Tween™ 20. Después de 1 h de incubación a 37°C seguida por 3 lavados, se detectó actividad de peroxidasa con reactivo 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (KPL Inc., Gaithersburg, MD) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

[00256] *Análisis estadístico*. Se realizó un análisis estadístico de los títulos de anticuerpos y de la correlación utilizando GraphPad Prism™ v6.05.

EJEMPLO 22: La fusión de antígenos y la combinación con una cepa de S. aureus atenuada viva inducen títulos de anticuerpos elevados en ratones – vacuna #7

[00257] Se producen los antígenos y la cepa de *S. aureus* Δ720ΔhemB viva atenuada según lo descrito en el Ejemplo 21. Los ratones son inmunizados y las IgGs detectadas según lo descrito en el Ejemplo 21.

[00258] Los resultados en la FIG. 16 muestran que la inmunización con la fusión SACOL0029-1867 ya sea cuando se coadministró con otros antígenos o con una cepa atenuada viva induce respuestas a los anticuerpos elevadas y específicas en ratones.

EJEMPLO 23: La cepa de S. aureus atenuada viva mejora significativamente la respuesta inmune a los anticuerpos contra algunos antígenos específicos – vacuna #7

[00259] Los antígenos y la cepa de *S. aureus* Δ720ΔhemB viva atenuada son producidos según lo descrito en el Ejemplo 21. Los ratones son inmunizados y las IgGs detectadas según lo descrito en el Ejemplo 21.

[00260] Los resultados en la FIG. 17 muestran que la inmunización con la cepa viva atenuada Δ720Δ*hemB* aumenta de manera significativa la producción de anticuerpos IgG específicos contra el antígeno SACOL0029, en comparación con lo obtenido con anticuerpos IgG de ratones inmunizados con la mezcla de proteínas solamente.

EJEMPLO 24: La cepa atenuada viva de *S. aureus* induce títulos de anticuerpos significativos contra proteínas de superficie adicionales de *S. aureus* – vacuna #7

[00261] Los antígenos y la cepa de S. aureus atenuada viva Δ720ΔhemB son producidos según lo descrito en el Ejemplo 21. Los ratones son inmunizados y las IgGs detectadas según lo descrito en el Ejemplo 21.

[00262] Los resultados en la FIG. 18 muestran que la inmunización con la cepa viva atenuada Δ720Δ*hemB* (por sí sola o cuando es administrada en conjunto con antígenos polipeptídicos) aumenta significativamente la producción de anticuerpos específicos contra la proteína de superficie estafilocócica ClfA, en comparación con lo logrado con la mezcla proteica por sí sola compuesta por SACOL0029, SACOL0442, SACOL0720, y SACOL0029-1867.

EJEMPLO 25: La cepa de *S. aureus* viva atenuada equilibra significativamente la respuesta inmune mediada por Th1/Th2 – vacuna #7

[00263] Los antígenos y la cepa de S. aureus atenuada viva Δ720ΔhemB son producidos según lo descrito en el Ejemplo 21.

[00264] Se detectaron isotipos de IgG2a e IgG1 séricos contra la proteína de fusión SACOL0029-1867 en sueros de ratones vacunados según lo descrito previamente y se determinó la relación de los títulos de IgG2a a IgG1 de cada ratón. El isotipo IgG2a está asociado con la respuesta inmune mediada por Th1 en ratones, mientras que IgG1 es un marcador para la respuesta mediada por Th2. Según lo descrito en el Ejemplo 5, la inducción de la producción de IgG2 en vacas y el grado de los títulos de IgG2 en la leche se correlaciona significativamente con la protección de las vacas contra una prueba con *S. aureus,* según lo juzgado por los niveles de las células somáticas correspondientes (RCS) o por los recuentos bacterianos (UFC) en la leche de las vacas (FIG. 4C).

[00265] Los resultados mostrados en las FIGs. 19 y 20 demuestran que la cepa viva atenuada Δ720Δ*hemB* incluida en la vacuna combinada para la inmunización (Δ720Δ*hemB S. aureus* administrada con SACOL0029, SACOL0442, SACOL0720, y

SACOL0029-1867) induce una relación significativamente superior de anticuerpos IgG2a/IgG1 contra las proteínas de fusión SACOL0029-1867 y SACOL0029 que lo que se pudo observar con la inmunización mediada por la mezcla de proteínas (SACOL0029, SACOL0442, SACOL0720, y SACOL0029-1867), dando como resultado una respuesta Th1/Th2 significativamente más equilibrada.

[00266] Los ejemplos 21 a 25 que anteceden muestran que incluso si se obtuvo una respuesta fuerte por los anticuerpos mediante la inmunización con diferentes antígenos (incluyendo por ejemplo, la fusión SACOL0029-1867) en una composición de mezcla de proteínas, la inmunización de ratones con una combinación de estos antígenos con una cepa atenuada viva mejoró significativamente las respuestas inmunes contra *S. aureus*, induciendo títulos más altos de anticuerpos contra algunos antígenos específicos (por ejemplo, SACOL0029), mediante la producción de anticuerpos contra otras proteínas estafilocócicas (por ejemplo, ClfA), y logrando una relación IgG2a/IgG1 más equilibrada, un buen marcador de una respuesta más fuerte tipo Th1, contra los antígenos administrados en conjunto con la cepa viva.

EJEMPLO 26: Expresión de proteínas recombinantes en la cepa *S. aureus* Δ*hemB*Δ720 – Vacunas #8, 9, 10 etc.

[00267] Genes SACOL0442, SACOL0720, SACOL0029, y/o SACOL1867 así como también la fusión (por ejemplo, tamaño de 50 AA o más) de los genes (o de los fragmentos de los mismos) SACOL0029 y SACOL1867 (SACOL0029-SACOL1867), fusiones de fragmentos (por ejemplo, epítopos) de SACOL720 y/o de SACOL0442 (fusión 720-720) (fusión 442-720) o cualquier otra fusión de genes o fragmentos de los mismos por ejemplo, SACOL0029-SACOL0442, SACOL0029-SACOL0720, SACOL0029-SACOL0720-SACOL0442, SACOL0029-SACOL0720-SACOL1867, SACOL0029-SACOL1867-SACOL0442 SACOL0442-SACOL0029-SACOL0720, SACOL0442-SACOL0029-SACOL0720, SACOL0442-SACOL1867-SACOL0720, SACOL0720-SACOL0442-SACOL1867, SACOL04029-SACOL1867-SACOL0720-SACOL0442, son clonados en el plásmido pCN36 (Charpentier *et al.*, 2004) bajo un promotor constitutivo (P*blaZ* del plásmido pCN40) (Charpentier *et al.*, 2004) y expresados en la cepa Δ*hemB*Δ720 de *S. aureus*. Se pronostica que ciertos antígenos de proteína propuestos en esta invención son una exotoxina, enterotoxina o superantígeno (por ejemplo,

SACOL0442) o proteínas útiles para la protección contra las defensas del huésped (por ejemplo, SACOL0720) y podrían interferir potencialmente con el sistema inmune del mamífero y la producción de anticuerpos, y/o muestran cierta toxicidad en el huésped. Si bien no se ha observado ese tipo de interferencia con la composición de la vacuna y las formulaciones descritas en esta invención, puede ser útil para modificar la proteína o polipéptido expresado en la cepa Δ*hemB*Δ720 de *S. aureus* de tal modo que los genes clonados no complementen su virulencia. A tal fin, es posible utilizar técnicas de biología molecular para suprimir o mutar la o las regiones putativas involucradas en ese tipo de actividad proteica sin perder inmunogenicidad (Chang *et al.*, 2008). Este es el método utilizado por los solicitantes para preparar los antígenos de las composiciones de las vacunas de la presente invención.

[00268] La expresión de productos proteicos recombinantes individuales por cada una de las cepas Δ*hemB*Δ720 de *S. aureus* que porta uno de los vectores de expresión construidos se valida mediante análisis LC-MS/MS. Brevemente, se centrifugaron cepas cultivadas en BHI con 15 µg/ml de tetraciclina hasta la fase logarítmica media y se inactivaron los pellets con etanol. Se mantuvieron las muestras a -20°C hasta la lisis celular y los procedimientos de digestión con tripsina. Se incuban las muestras con lisostafina y tripsina a 37°C, seguido por la disrupción celular mediante homogenización mecánica utilizando perlas de vidrio y un homogenizador celular Beadbeater. Luego, se centrifugan los lisados durante 25 min a 13 000 rpm a 4 °C a fin de eliminar los residuos celulares, antes de seguir con la digestión proteica con tripsina, se llevaron a cabo la reducción y alquilación mediante procedimientos convencionales antes de la inyección de muestra para la detección de proteína utilizando el método MRM de LC-MS/MS.

[00269] Alternativamente, también se confirma la expresión de proteínas recombinantes mediante Western blots de los lisados bacterianos.

EJEMPLO 27: Inmunización de ratones con cepas atenuadas que expresan antígenos – Vacunas #8, etc.

[00270] Se vacunan ratones hembra CD-1 mediante dos inyecciones subcutáneas con dos semanas de diferencia. Cada una de las cepas Δ*hemB*Δ720 de *S. aureus* que porta o no uno de los vectores de expresión construidos, se diluye en solución salina y se administra en un volumen final de 100 µl por dosis. El grupo 1 recibe una cepa doble

mutante sola; el grupo 2 recibe una cepa doble mutante que expresa la fusión SACOL0029-1867; el grupo 3 recibe una cepa doble mutante que expresa la fusión SACOL0029-0442; el grupo 4 recibe una cepa doble mutante que expresa la fusión SACOL0029-0720; el grupo 5 recibe una mezcla de cepas de doble mutante, una expresa la fusión SACOL0029-1867 y la otra expresa la fusión SACOL0029-0442; el grupo 6 recibe una mezcla de cepas de doble mutante, una expresa la fusión SACOL0029-1867 y la otra expresa la fusión SACOL0029-0720; y el grupo 7 recibe una mezcla de cepas de doble mutante. Se extraen muestras de sangre justo antes de la primera inyección y doce días después de la segunda. Se deja transcurrir un tiempo para que las muestras coagulen a temperatura ambiente durante una hora, luego se centrifugan a 2 000 g durante 10 min a 4°C. Se recolectan los sobrenadantes (sueros) y se mantienen a -20°C hasta el posterior análisis. Los ratones son sacrificados por eutanasia en el día 27 y se recolecta la sangre mediante punción cardíaca. Se recuperan los sueros inmunes, se distribuyen en alícuotas y se almacenan como para los sueros preinmunes.

[00271] Se evalúa la respuesta inmune a la vacunación mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) para determinar la presencia de anticuerpos IgG policlonales séricos dirigidos hacia células enteras de *S. aureus* (cepa Wood) o proteínas recombinantes específicas. Se utiliza IgG-HRP anti-ratón (HRP: peroxidasa de rábano picante) como un anticuerpo secundario para detectar la producción colorimétrica de la oxidación del sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) mediante actividad de peroxidasa utilizando un espectrofotómetro.

REFERENCIAS

Allard M, Ster C., Jacob CL, Scholl D, Diarra MS, Lacasse P, y Malouin F, 2013. The expression of a putative exotoxin and an ABC transporter during bovine intramammary infection contributes to the virulence of Staphylococcus aureus. Vet. Microbiol. 162:761–70.

Allard, M., C. Ster, L. St-James, P. Lacasse, M.S. Diarra, C. L. Jacob, y F. Malouin. 2008. Transcriptional Analysis of In Vivo-Expressed Genes in Staphylococcus aureus During Bovine Mastitis. American Society for Microbiology General Meeting. Boston, USA. 1-5 junio, 2008 (Poster)

Allard, M., H. Moisan, E. Brouillette, A.L. Gervais, M. Jacques, P. Lacasse, M.S. Diarra, y F. Malouin. 2006. Transcriptional modulation of some Staphylococcus aureus iron-regulated genes during growth in vitro and in a tissue cage model in vivo. Microbes Infect. 7:1679-1690.

Asli A, Brouillette E, Krause KM, Nichols WW, Malouin F. Distinctive binding of avibactam to penicillin-binding proteins of gram-negative and gram-positive bacteria. Antimicrob Agents Chemother. 2016;60: 752–756.

Atalla, H., C. Gyles, y B. Mallard. 2010. Persistence of a Staphylococcus aureus small colony variants (S. aureus SCV) within bovine mammary epithelial cells. Vet. Microbiol. Elsevier B.V. 143:319–28.

Atalla, H., C. Gyles, y B. Mallard. 2011. Staphylococcus aureus small colony variants (SCVs) and their role in disease. Anim. Health Res. Rev. 12:33–45.

Atalla, H., C. Gyles, B. Wilkie, K. Leslie, y B. Mallard. 2009. Somatic cell scores and clinical signs following experimental intramammary infection of dairy cows with a Staphylococcus aureus small colony variant (S. aureus SCV) in comparison to other bovine strains. Vet. Microbiol. 137:326–34.

Atalla, H., C. Gyles, C.L. Jacob, H. Moisan, F. Malouin, y B. Mallard. 2008. Characterization of a Staphylococcus aureus small colony variant (SCV) associated with persistent bovine mastitis. Foodborne Pathog 5:785-799.

Barbagelata, M. S., L. Alvarez, M. Gordiola, L. Tuchscherr, C. von Eiff, K. Becker, D. Sordelli, y F. Buzzola. 2011. Auxotrophic mutant of Staphylococcus aureus interferes with nasal colonization by the wild type. Microbes Infect. 13:1081–90.

Barkema, H.W., Y.H. Schukken, y R.N. Zadoks. 2006. Invited Review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine Staphylococcus aureus mastitis. J Dairy Sci. 89:1877-1895.

Barrio, M. B., P. Rainard, F.B.Gilbert, B. Poutrel. 2003. Assessment of the opsonic activity of purified bovine sIgA following intramammary immunization of cows with Staphylococcus aureus. J. Dairy Sci. 86 :2884-2894.

Bharathan, M., y I. K. Mullarky. 2011. Targeting mucosal immunity in the battle to develop a mastitis vaccine. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 16:409–19.

Bowdish, D.M.E., Davidson, D.J., Scott, M.G. y Hancock, R.E.W., 2005.

Immunomodulatory Activities of Small Host Defense Peptides. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49(5): 1727–1732.

Bradley RD Rothstein, G, P. P. C. 1982. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. Blood 60:618–622.

Bradley, A. 2002. Bovine mastitis: an evolving disease. Vet J. 164:116-128.

Brouillette, E., A. Martinez, B. J. Boyll, N. E. Allen, y F. Malouin. 2004. Persistence of a Staphylococcus aureus small-colony variant under antibiotic pressure in vivo. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 41:35–41.

Brouillette, E., y F. Malouin. 2005. The pathogenesis and control of Staphylococcus aureus-induced mastitis: study models in the mouse. Microbes Infect. 7:560–8.

Brouillette, E., G. Grondin, B. G. Talbot, y F. Malouin. 2005. Inflammatory cell infiltration as an indicator of Staphylococcus aureus infection and therapeutic efficacy in experimental mouse mastitis. Vet. Immunol. Immunopathol. 104:163–9.

Brouillette, E., M. Hyodo, Y. Hayakawa, D. K. Karaolis, y F. Malouin. 2005. 3',5'-cyclic diguanylic acid reduces the virulence of biofilm-forming Staphylococcus aureus strains in a mouse model of mastitis infection. Antimicrob. Agents Chemother. 49:3109-3113.

Brückner, R. 1997. Gene replacement in Staphylococcus carnosus and Staphylococcus xylosus. FEMS Microbiol. Lett. 151:1–8.

Burlak, C., C.H. Hammer, M.A. Robinson, A.R. Whitney, M.J. McGavin, B.N. Kreiswirth, y F.R. Deleo. 2007. Global analysis of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus exoproteins reveals molecules produced in vitro and during infection. Cell Microbiol. 9:1172-1190.

Buzzola, F. R., L. P. Alvarez, L. P. N. Tuchscherr, M. S. Barbagelata, S. M. Lattar, L. Calvinho, y D. O. Sordelli. 2007. Differential abilities of capsulated and noncapsulated Staphylococcus aureus isolates from diverse agr groups to invade mammary epithelial cells. Infect. Immun. 75:886–91.

Buzzola, F. R., M. S. Barbagelata, R. L. Caccuri, y D. O. Sordelli. 2006. Attenuation and persistence of and ability to induce protective immunity to a Staphylococcus aureus aroA mutant in mice. Infect. Immun. 74:3498–506.

Chang, B.S., J.S. Moon, H.M. Kang, Y.I. Kim, H.K. Lee, J.D. Kim, B.S. Lee, H.C. Koo, Y.H.

Park. 2008. Protective effects of recombinant staphylococcal enterotoxin type C mutant vaccine against experimental bovine infection by a strain of Staphylococcus aureus isolated from subclinical mastitis in dairy cattle. Vaccine. 26:2081-2091.

Charpentier E, Anton AI, Barry P, Alfonso B, Fang Y, Novick RP. 2004. Novel cassette-based shuttle vector system for gram-positive bacteria. Appl Environemental Microbiol 70:6076–6085.

Chen J., H Liu., J. Yang, K. Chou. 2007. Prediction of linear B-cell epitopes using amino acid pair antigenicity scale. Amino Acids 33: 423-428.

Chen et. al, Adv Drug Deliv Rev. (2013), 65(10):1357-69.

Chen Y., L. Caruso, B. McClane, D. Fisher, P. Gupta. 2007. Disruption of a toxin by introduction of a foreign gene into the chromosome of Clostridium perfringens using targetron induced mutagenesis. Plasmid. 58:182-189.

Cui, L., J. Lian, y H. Neoh. 2005. DNA microarray-based identification of genes associated with glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. agents … 49:3404–3413.

De Groot, A.S., J. McMurry, y L. Moise. 2008. Prediction of immunogenicity: in silico paradigms, ex vivo and in vivo correlates. Curr Opinion in Pharmacol. 8:620-626.

Dehal PS, Joachimiak MP, Price MN, Bates JT, Baumohl JK, Chivian D, Friedland GD, Huang KH, Keller K, Novichkov PS, Dubchak IL, Alm EJ, Arkin AP. MicrobesOnline: an integrated portal for comparative and functional genomics. Nucleic Acids Res. Enero 2010; 38(Database issue): D396-400. Epub 11 Nov 2009.

Detmer, A., y J. Glenting. 2006. Live bacterial vaccines–a review and identification of potential hazards. Microb. Cell Fact. 12:1–12.

Diarra, M. S., D. Petitclerc, y P. Lacasse. 2002. Response of Staphylococcus aureus isolates from bovine mastitis to exogenous iron sources. J. Dairy Sci. 85:2141-2148.

EL-Manzalawy Y, Dobbs D, Honavar V. 2008a. Predicting linear B-cell epitopes using string kernels. J Mol Recognit 21: 243-255.

EL-Manzalawy Y, Dobbs D, Honavar V. 2008b. Predicting flexible length linear B-cell epitopes. 7th International Conference on Computational Systems Bioinformatics, Stanford, CA. pp. 121-131

Eng, N.F., S. Garlapati, V. Gerdts, A. Potter, L.A. Babiuk, y G.K. Mutwiri. 2010. The

Potential of Polyphosphazenes for Delivery of Vaccine Antigens and Immunotherapeutic Agents. Curr Drug Deliv. 7(1):13-30.

Falla, T.J., D. Karunaratne, N., Hancock, R.E.W. 1996. Mode of Action of the Antimicrobial Peptide Indolicidin. The Journal of Biological Chemistry, 271(32), Tema del 9 de agosto, pp. 19298 –19303.

Falord, M., G. Karimova, A. Hiron, y T. Msadek. 2012. GraXSR proteins interact with the VraFG ABC transporter to form a five-component system required for cationic antimicrobial peptide sensing and resistance in Staphylococcus aureus. Antimicrob. Agents Chemother. 56:1047–58.

Falord, M., U. Mäder, A. Hiron, M. Débarbouillé, y T. Msadek. 2011. Investigation of the Staphylococcus aureus GraSR Regulon Reveals Novel Links to Virulence, Stress Response and Cell Wall Signal Transduction Pathways. PLoS One 6:e21323.

Ferens, W. a, y G. a Bohach. 2000. Persistence of Staphylococcus aureus on mucosal membranes: superantigens and internalization by host cells. J. Lab. Clin. Med. 135:225–30.

Foster, T. J. 2009. Colonization and infection of the human host by staphylococci: adhesion, survival and immune evasion. Vet. Dermatol. 20:456–70.

Fowler, V., y R. Proctor. 2014. Where does a Staphylococcus aureus vaccine stand? Clin. Microbiol. Infect. 20 Supl 5:66–75.

García, V., M. Gómez, M. Iglesias, N. Sanjuan, M. Gherardi, M. C. Cerquetti, y D. Sordelli. 1996. Intramammary immunization with live-attenuated Staphylococcus aureus: microbiological and immunological studies in a mouse mastitis model. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 14:45–51.

Gardy, J. L., M. R. Laird, F. Chen, S. Rey, C. J. Walsh, M. Ester y F. S. L. Brinkman. 2005. PSORTb v.2.0: Expanded prediction of bacterial protein subcellular localization and insights gained from comparative proteome analysis. Bioinformatics 21(5):617-623; doi:10.1093/bioinformatics/bti057

Garzoni, C., P. Francois, A. Huyghe, S. Couzinet, C. Tapparel, Y. Charbonnier, A. Renzoni, S. Lucchini, D.P. Lew, P. Vaudaux, W,L. Kelley, y J. Schrenzel. 2007. A global view of Staphylococcus aureus whole genome expression upon internalization in human epithelial cells. BMC Genomics. 8:171.

Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press (2005), pp. 571-607

Gaupp, R., N. Ledala, y G. a Somerville. 2012. Staphylococcal response to oxidative stress. Front. Cell. Infect. Microbiol. 2:33.

Gläser, R., K. Becker, C. von Eiff, U. Meyer-Hoffert, y J. Harder. 2014. Decreased Susceptibility of Staphylococcus aureus Small-Colony Variants Toward Human Antimicrobial Peptides. J. Invest. Dermatol. 134:2347–50.

Goerke, C., S. Campana, M.G. Bayer, G. Döring, K. Botzenhart, y C. Wolz. 2000. Direct quantitative transcript analysis of the agr regulon of Staphylococcus aureus during human infection in comparison to the expression profile in vitro. Infect Immun. 68:1304-1311.

Griffiths, K. L., y S. a Khader. 2014. Novel vaccine approaches for protection against intracellular pathogens. Curr. Opin. Immunol. Elsevier Ltd 28:58–63.

Guidry, A.J., L.M. Berning, C.N. Hambleton.1993. Opsonization of Staphylococcus aureus by bovine immunoglobulin isotypes. J. of Dairy Sci. 76:1285-1289.

Hancock, R.E.W., y Diamond, G., 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. Trends In Microbiology. 8(9):402**.**

Haveri, M., A. Roslöf, L. Rantala, y S. Pyörälä. 2007. Virulence genes of bovine Staphylococcus aureus from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. J Appl Microbiol. 103:993-1000.

Hogarth, C.J., J.L. Fitzpatrick, A.M. Nolan, F.J. Young, A. Pitt, y P.D. Eckersall. 2004. Differential protein composition of bovine whey: a comparison of whey from healthy animals and from those with clinical mastitis. Proteomics. 4:2094-2100.

Horsburgh, M. J., J. L. Aish, I. J. White, J. K. Lithgow, S. J. Foster, y L. Shaw. 2002. σ B Modulates Virulence Determinant Expression and Stress Resistance: Characterization of a Functional rsbU Strain Derived from Staphylococcus aureus 8325-4. J. Bacteriol. 184:5457–5467.

Jayarao, B.M., D.R. Henning. 2001. Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk. J Dairy Sci. 84:2157-2162.

Kafala, B., y a Sasarman. 1997. Isolation of the Staphylococcus aureus hemCDBL gene

cluster coding for early steps in heme biosynthesis. Gene 199:231–9.

Kahl B.C., 2014. Small colony variants (VCP) of Staphylococcus aureus – A bacterial survival strategy. Infection, Genetics and Evolution 21: 515–522.

Karaolis, D.K., T.K. Means, D. Yang, M. Takahashi, T. Yoshimura, E. Muraille, D. Philpott, J.T. Schroeder, M. Hyodo, Y. Hayakawa, B.G. Talbot, E. Brouillette, y F. Malouin. 2007. Bacterial c-di-GMP is an immunostimulatory molecule. J Immunol. 178:2171-2181.

Kasturi, S.P. et al. 2011. Programming the magnitude and persistence of antibody responses with innate immunity. Nature 470:543-547.

Kawada-Matsuo, M., y Y. Yoshida. 2011. Role of two-component systems in the resistance of Staphylococcus aureus to antibacterial agents. Virulence 2:427–430.

Kawada-Matsuo, M., Y. Yoshida, T. Zendo, J. Nagao, Y. Oogai, Y. Nakamura, K. Sonomoto, N. Nakamura, y H. Komatsuzawa. 2013. Three distinct two-component systems are involved in resistance to the class I bacteriocins, Nukacin ISK-1 and nisin A, in Staphylococcus aureus. PLoS One 8: e69455.

Kerro-Dego, O., T. Prysliak, A. a Potter, y J. Perez-Casal. 2006. DNA-protein immunization against the GapB and GapC proteins of a mastitis isolate of Staphylococcus aureus. Vet. Immunol. Immunopathol. 113:125–38.

Kollaritsch, H., S. J. Cryz, a B. Lang, C. Herzog, J. U. Que, y G. Wiedermann. 2000. Local and systemic immune responses to combined vibrio cholerae CVD103-HgR and salmonella typhi ty21a live oral vaccines after primary immunization and reimmunization. Vaccine 18:3031–9.

Koo, S. P., A. S. Bayer, H. G. Sahl, R. A. Proctor, M. R. Yeaman, S. Koo, A. S. Bayer, H. Sahl, y R. A. Proctor. 1996. Staphylocidal action of thrombin-induced platelet microbicidal protein is not solely dependent on transmembrane potential. These include: Staphylocidal Action of Thrombin-Induced Platelet Microbicidal Protein Is Not Solely Dependent on Transmembrane Pot 64.

Kraus, D., S. Herbert, S. a Kristian, A. Khosravi, V. Nizet, F. Götz, y A. Peschel. 2008. The GraRS regulatory system controls Staphylococcus aureus susceptibility to antimicrobial host defenses. BMC Microbiol. 8:85.

Kreiswirth, B. N., S. Löfdahl, M. J. Betley, M. O'Reilly, P. M. Schlievert, M. S. Bergdoll, y R.

P. Novick. 1983. The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. Nature 305:709–12.

Kubica, M., K. Guzik, J. Koziel, M. Zarebski, W. Richter, B. Gajkowska, A. Golda, A. Maciag-Gudowska, K. Brix, L. Shaw, T. Foster, y J. Potempa. 2008. A potential new pathway for Staphylococcus aureus dissemination: the silent survival of S. aureus phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. PLoS One 3:e1409.

Kuroda, M., K. Kuwahara-Arai, y K. Hiramatsu. 2000. Identification of the up- and down-regulated genes in vancomycin-resistant Staphylococcus aureus strains Mu3 and Mu50 by cDNA differential hybridization method. Biochem. Biophys. Res. Commun. 269:485–90.

Lammers, A., E. Kruijt, K. C. van de, P. J. Nuijten, y H. E. Smith. 2000. Identification of Staphylococcus aureus genes expressed during growth in milk: a useful model for selection of genes important in bovine mastitis? Microbiology. 146:981-987.

Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H.*, Valentin F.*, Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J. y Higgins D.G. 2007. ClustalW and ClustalX version 2. Bioinformatics 2007 23(21): 2947-2948.

Leitner, G., O. Krifucks, M. D. Kiran, y N. Balaban. 2011. Vaccine development for the prevention of staphylococcal mastitis in dairy cows. Vet. Immunol. Immunopathol. Elsevier B.V. 142:25–35.

Li, M., D. J. Cha, Y. Lai, A. E. Villaruz, D. E. Sturdevant, y M. Otto. 2007. The antimicrobial peptide-sensing system aps of Staphylococcus aureus. Mol. Microbiol. 66:1136–47.

Lin, L., A. S. Ibrahim, X. Xu, J. M. Farber, V. Avanesian, B. Baquir, Y. Fu, S. W. French, J. E. Edwards, y B. Spellberg. 2009. Th1-Th17 cells mediate protective adaptive immunity against Staphylococcus aureus and Candida albicans infection in mice. PLoS Pathog. 5:e1000703.

Linghua, Z., T. Xingshan, Z. Fengzhen. 2006. The efficacy of CpG oligodinucleotides, en combinación con conventional adjuvants, as immunological adjuvants to swine streptococcic septicemia vaccine in piglets in vivo. Int Immunopharmacol. 6:1267-76.

Löffler, B., L. Tuchscherr, S. Niemann, y G. Peters. 2013. Staphylococcus aureus

persistence in non-professional phagocytes. Int. J. Med. Microbiol. Elsevier GmbH.

Loiselle, M.C., C. Ster, B.G. Talbot, X. Zhao, G.F. Wagner, Y.R. Boisclair, y P. Lacasse. 2009. Impact of postpartum milking frequency on the immune system and the blood metabolite concentration of dairy cows. J Dairy Sci. 92:1900-1912.

Lowe, A.M., D.T. Beattie, y R.L. Deresiewicz. 1998. Identification of novel staphylococcal virulence genes by in vivo expression technology. Mol Microbiol. 27:967-976.

Maresso, A.W., y O. Schneewind. 2006. Iron acquisition and transport in Staphylococcus aureus. Biometals. 19:193-203.

Maresso AW, Schneewind O. Sortase as a target of anti-infective therapy. Pharmacol Rev. 2008 Mar;60(1):128-41.

Mayer, S.J., A.E. Waterman, P.M. Keen, N. Craven, y F.J. Bourne. 1988. Oxygen concentration in milk of healthy and mastitic cows and implications of low oxygen tension for the killing of Staphylococcus aureus by bovine neutrophils. J Dairy Res 55:513-519.

Meehl, M., S. Herbert, F. Götz, y A. Cheung. 2007. Interaction of the GraRS two-component system with the VraFG ABC transporter to support vancomycin-intermediate resistance in Staphylococcus aureus. Antimicrob. Agents Chemother. 51:2679–89.

Melchior, M.B., M.H. vanOsch, R.M. Graat, E. van Duijkeren, D.J. Mevius, N. Nielen, W. Gaastra, J. Fink-Gremmels. 2009. Biofilm formation and genotyping of Staphylococcus aureus bovine mastitis isolates: evidence for lack of penicillin-resistance in Agr-type II strains. Vet. Microbiol. 137:83-89.

Merino, N., A. Toledo-Arana, M. Vergara-Irigaray, J. Valle, C. Solano, E. Calvo, J. A. Lopez, T. J. Foster, J. R. Penadés, y I. Lasa. 2009. Protein A-mediated multicellular behavior in Staphylococcus aureus. J. Bacteriol. 191:832–43.

Middleton, J. R., C. D. Luby, y D. S. Adams. 2009. Efficacy of vaccination against staphylococcal mastitis: a review and new data. Vet. Microbiol. 134:192–8.

Middleton, J.R. 2008. Staphylococcus aureus antigens and challenges in vaccine development. Expert Rev Vaccines. 7(6):805-815.

Mitchell, G., A. Fugère, K. Pépin Gaudreau, E. Brouillette, E. H. Frost, A. M. Cantin, y F. Malouin. 2013. SigB is a dominant regulator of virulence in Staphylococcus aureus

small-colony variants. PLoS One 8:e65018.

Mitchell, G., C.A. Lamontagne, ,E. Brouillette, G. Grondin , B.G. Talbot, M. Grandbois, F. Malouin. 2008. Staphylococcus aureus SigB activity promotes a strong fibronectin-bacterium interaction which may sustain host tissue colonization by small-colony variants isolated from cystic fibrosis patients. Mol Microbiol 70:1540-1555.

Mitchell, G., C.-A. Lamontagne, E. Brouillette, G. Grondin, B. G. Talbot, M. Grandbois, y F. Malouin. 2008. Staphylococcus aureus SigB activity promotes a strong fibronectin-bacterium interaction which may sustain host tissue colonization by small-colony variants isolated from cystic fibrosis patients. Mol. Microbiol. 70:1540–55.

Mitchell, G., G. Grondin, G. Bilodeau, A. M. Cantin, y F. Malouin. 2011. Infection of Polarized Airway Epithelial Cells by Normal and Small-Colony Variant Strains of Staphylococcus aureus Is Increased in Cells with Abnormal Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Function and Is Influenced by NF-{kappa}B. Infect. Immun. 79:3541–51.

Mitra SD, Velu D, Bhuvana M, Krithiga N, Banerjee A, Shome R, et al. Staphylococcus aureus spa type t267, clonal ancestor of bovine subclinical mastitis in India. J Appl Microbiol. 2013;114: 1604–1615.

Moisan, H., E. Brouillette, C.L. Jacob, P. Langlois-Bégin, S. Michaud, y F. Malouin. 2006. Transcription of virulence factors in Staphylococcus aureus small-colony variants isolated from cystic fibrosis patients is influenced by SigB. J Bacteriol. 188:64-76.

Myllys, V., J. Ridell, J. Bjorkroth, I. Biese, y S. Pyorala. 1997. Persistence in bovine mastitis of Staphylococcus aureus clones as assessed by random amplified polymorphic DNA analysis, ribotyping and biotyping. Vet Microbiol. 57:245-251.

National Mastitis Council. 1996. Current Concept of Bovine Mastitis. 4 ed. National Mastitis Council, Madison, WI.

Nickerson, S. C., W. E. Owens, L. K. Fox, C. C. Scheifinger, T. R. Shryock, y T. E. Spike. 1999. Comparison of tilmicosin and cephapirin as therapeutics for Staphylococcus aureus mastitis at dry-off. J Dairy Sci. 82:696–703.

Novick RP.Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. Mol Microbiol. 2003 Jun;48(6):1429-49.

Novick RP, Geisinger E. Quorum sensing in staphylococci. Annu Rev Genet. 2008;42:

541-64.

Overton, I. M., S. Graham, K. a Gould, J. Hinds, C. H. Botting, S. Shirran, G. J. Barton, y P. J. Coote. 2011. Global network analysis of drug tolerance, mode of action and virulence in methicillin-resistant S. aureus. BMC Syst. Biol. BioMed Central Ltd 5:68.

Owens, W.E., C.H. Ray, J.L. Watts, y R.J. Yancey. 1997. Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility tests for bovine mastitis. J Dairy Sci. 80:313-317.

Park, Y.K., H.C. Koo, S.H. Kim, S.Y. Hwang, W.K. Jung, J. Kim, S. Shin, R. Kim, y Y. Park. 2007. The analysis of milk components and pathogenic bacteria isolated from bovine raw milk in Korea. J Dairy Sci. 90:5405–5414.

Pasetti, M. F., J. K. Simon, M. B. Sztein, y M. M. Levine. 2011. Immunology of gut mucosal vaccines. Immunol. Rev. 239:125–48.

Peles, F., M. Wagner, L. Varga, I. Hein, P. Rieck, K. Gutser, P. Keresztúri, G. Kardos, I. Turcsányi, B. Béri, y A. Szabó. 2007. Characterization of Staphylococcus aureus strains isolated from bovine milk in Hungary. Int J Food Microbiol. 118:186-93.

Pellegrino, M., J. Giraudo, C. Raspanti, L. Odierno, y C. Bogni. 2010. Efficacy of immunization against bovine mastitis using a Staphylococcus aureus avirulent mutant vaccine. Vaccine 28:4523–8.

Pellegrino, M., J. Giraudo, C. Raspanti, R. Nagel, L. Odierno, V. Primo, y C. Bogni. 2008. Experimental trial in heifers vaccinated with Staphylococcus aureus avirulent mutant against bovine mastitis. Vet. Microbiol. 127:186–90.

Peterson, J. D., Umayam, L. A., Dickinson, T., Hickey, E. K., White, O. 2001. The Comprehensive Microbial Resource. Nucleic Acids Res. 29(1): 123-5.

Petitclerc,D., K. Lauzon, A. Cochu, C. Ster, M.S. Diarra, y P. Lacasse. 2007. Efficacy of a lactoferrin-penicillin combination to treat {beta}-lactam-resistant Staphylococcus aureus mastitis. J Dairy Sci. 90:2778-2787.

Pragman, A.A., y P.M. Schlievert. 2004. Virulence regulation in Staphylococcus aureus: the need for in vivo analysis of virulence factor regulation. FEMS Immunol Med Microbiol. 42:147-154.

Proctor, R. a, C. von Eiff, B. C. Kahl, K. Becker, P. McNamara, M. Herrmann, y G. Peters. 2006. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent

and recurrent infections. Nat. Rev. Microbiol. 4:295–305.

Proctor, R. a. 2012. Challenges for a universal Staphylococcus aureus vaccine. Clin. Infect. Dis. 54:1179–86.

Proctor, R. a., A. Kriegeskorte, B. C. Kahl, K. Becker, B. Löffler, y G. Peters. 2014. Staphylococcus aureus Small Colony Variants (SCVs): a road map for the metabolic pathways involved in persistent infections. Front. Cell. Infect. Microbiol. 4:1–8.

Pulli, B., M. Ali, R. Forghani, S. Schob, K. L. C. Hsieh, G. Wojtkiewicz, J. J. Linnoila, y J. W. Chen. 2013. Measuring myeloperoxidase activity in biological samples. PLoS One 8: e67976.

Reyher, K. K., S. Dufour, H. W. Barkema, L. Des Côteaux, T. J. Devries, I. R. Dohoo, G. P. Keefe, J.-P. Roy, y D. T. Scholl. 2011. The National Cohort of Dairy Farms--a data collection platform for mastitis research in Canada. J. Dairy Sci. Elsevier 94:1616–26.

Sadowska, B., A. Bonar, C. von Eiff, R. A. Proctor, M. Chmiela, W. Rudnicka, y B. Różalska. 2002. Characteristics of Staphylococcus aureus, isolated from airways of cystic fibrosis patients, and their small colony variants. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 32:191–7.

Saha, S y Raghava G.P.S., (2006) Prediction of Continuous B-cell Epitopes in an Antigen Using Recurrent Neural Network. Proteins, 65(1),40-48.

Saha.S y Raghava G.P.S. BcePred: Prediction of Continuous B-Cell Epitopes in Antigenic Sequences Using Physico-chemical Properties. In G.Nicosia, V.Cutello, P.J. Bentley and J.Timis (Eds.) ICARIS 2004, LNCS 3239, 197-204, Springer, 2004.

Sandholm, M., L. Kaartinen, y S. Pyorala. 1990. Bovine mastitis - why does antibiotic therapy not always work? An overview. J Vet Phamacol Therap. 13:248-260.

Schaffer, A.C., y J.C. Lee. 2009. Staphylococcal vaccines and immunotherapies. Infect Dis Clin North Am. 23:153-171.

Sears, P.M. y McCarthy, K.K. 2003. Management and treatment of staphylococcal mastitis. Vet Clin North Am Food Anim Pract 19:171-185.

Sendi, P., y R. a Proctor. 2009. Staphylococcus aureus as an intracellular pathogen: the role of small colony variants. Trends Microbiol. 17:54–8.

Senn, M. M., M. Bischoff, C. Von Eiff, B. Berger-bächi, y B. Berger-ba. 2005. σ B Activity in

a Staphylococcus aureus hemB Mutant. J. Bacteriol. 187:7397–7406.

Sibbald, M.J., A.K. Ziebandt, S. Engelmann, M. Hecker, A. de Jong, H.J. Harmsen, G.C. Raangs, I. Stokroos, J.P. Arends, J.Y. Dubois, y J.M. van Dijl. 2006. Mapping the pathways to staphylococcal pathogenesis by comparative secretomics. Microbiol Mol Biol Rev. 70:755-788.

Silanikove, N., F. Shapiro, y G. Leitner. 2007. Posttranslational ruling of xanthine oxidase activity in bovine milk by its substrates. Biochem Biophys Res Commun. 363:561-565.

Somerville, G.A., y R.A. Proctor. 2009. At the crossroads of bacterial metabolism and virulence factor synthesis in Staphylococci. Microbiol Mol Biol Rev. 73:233-248.

Spellberg, B., y R. Daum. 2012. Development of a vaccine against Staphylococcus aureus. Semin. Immunopathol. 34:335–48.

Sprickler A.R. y J.A. Roth. Adjuvants in veterinary vaccines: mode of action and adverse effects. 2003. 17:273-281.

Srinivasan, V., A.A. Sawant, B.E. Gillespie, S.J. Headrick, L. Ceasaris, y S.P. Oliver. 2006. Prevalence of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin genes in Staphylococcus aureus isolated from milk of cows with mastitis. Foodborne Pathog Dis. 3:274-83.

Srivastava S, Singh V, Kumar V, Verma PC, Srivastava R, Basu V, Gupta V, Rawat AK. Identification of regulatory elements in 16S rRNA gene of Acinetobacter species isolated from water sample. Bioinformation. 2008; 3(4):173-6. Epub 2008 Dec 6.

Ster, C., M. Allard, S. Boulanger, M. Lamontagne Boulet, J. Mulhbacher, D. a Lafontaine, E. Marsault, P. Lacasse, y F. Malouin. 2013. Experimental treatment of Staphylococcus aureus bovine intramammary infection using a guanine riboswitch ligand analog. J. Dairy Sci. Elsevier 96:1000–8.

Sutra, L., y B. Poutrel. 1994. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to Staphylococcus aureus. J. Med. Microbiol. 40:79–89.

Taverna, F., A. Negri, R. Piccinini, A. Zecconi, S. Nonnis, S. Ronchi, y G. Tedeschi. 2007. Characterization of cell wall associated proteins of a Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis case by a proteomic approach. Vet Microbiol. 119:240-247

Tollersrud, T., A.H. Kampen, y K. Kenny. 2006. Staphylococcus aureus enterotoxin D is

secreted in milk and stimulates specific antibody responses in cows in the course of experimental intramammary infection. Infect Immun. 74:3507-3512.

Tuchscherr, L., E. Medina, M. Hussain, W. Völker, V. Heitmann, S. Niemann, D. Holzinger, J. Roth, R. a Proctor, K. Becker, G. Peters, y B. Löffler. 2011. Staphylococcus aureus phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. EMBO Mol. Med. 3:129–41.

Tuchscherr, L., V. Heitmann, M. Hussain, D. Viemann, J. Roth, C. von Eiff, G. Peters, K. Becker, y B. Löffler. 2010. Staphylococcus aureus small-colony variants are adapted phenotypes for intracellular persistence. J. Infect. Dis. 202:1031–40.

Tuchscherr, L.P., F.R. Buzzola, L.P. Alvarez, J.C. Lee, y D.O. Sordelli. 2008. Antibodies to capsular polysaccharide and clumping factor A prevent mastitis and the emergence of unencapsulated and small-colony variants of Staphylococcus aureus in mice. Infect Immun. 76:5738-5744.

Tusnády, G.E. y Simon, I. 2001. The HMMTOP transmembrane topology prediction server" Bioinformatics 17, 849-850.

Veh KA, Klein RC, Ster C, Keefe G, Lacasse P, Scholl D, et al. Genotypic and phenotypic characterization of Staphylococcus aureus causing persistent and nonpersistent subclinical bovine intramammary infections during lactation or the dry period. J Dairy Sci. 2015;98: 155–168

Von Eiff, C., P. McNamara, K. Becker, X. Lei, M. Ziman, B. R. Bochner, G. Peters, y R. A. Proctor. 2006. Phenotype Microarray Profiling of Staphylococcus aureus menD and hemB Mutants with the Small-Colony-Variant Phenotype Phenotype Microarray Profiling of Staphylococcus aureus menD and hemB Mutants with the Small-Colony-Variant Phenotype †. J. Bacteriol. 188:687–693.

Voyich, J.M., K.R. Braughton, D.E. Sturdevant, A.R. Whitney, B. Saïd-Salim, S.F. Porcella, R.D. Long, D.W. Dorward, D.J. Gardner, B.N. Kreiswirth, J.M. Musser, y F.R. DeLeo. 2005. Insights into mechanisms used by Staphylococcus aureus to avoid destruction by human neutrophils. J Immunol. 175:3907-3919.

Watson, D. L. 1984. Evaluation of attenuated, live staphylococcal mastitis vaccine in lactating heifers. J. Dairy Sci. 67:2608–13.

Whist, A. C., O. Osterås, y L. Sølverød. 2009. Association between isolation of

Staphylococcus aureus one week after calving and milk yield, somatic cell count, clinical mastitis, and culling through the remaining lactation. J. Dairy Res. 76:24–35.

WO/2003/091279

WO/2004/043405

WO/2005/007683

WO/2006/059846

WO/2008/152447

Xia, Y., y J. L. Zweier. 1997. Measurement of Myeloperoxidase in Leukocyte-Containing Tissues. Anal. Biochem. 245:93–96.

Yang, S.-J., A. S. Bayer, N. N. Mishra, M. Meehl, N. Ledala, M. R. Yeaman, Y. Q. Xiong, y A. L. Cheung. 2012. The Staphylococcus aureus Two-Component Regulatory System, GraRS, Senses and Confers Resistance to Selected Cationic Antimicrobial Peptides. Infect. Immun. 80:74–81.

Zecconi, A., R. Piccinini, y L. K. Fox. 2003. Epidemiologic study of intramammary infections with Staphylococcus aureus during a control program in nine commercial dairy herds. J. Am. Vet. Med. Assoc. 223:684–8.

Zhang, C., J. Yang, y L. K. Jennings. 2004. Non – Leukocyte-Derived Reactive Oxygen Species. Diabetes 53:2950–2959.

Ziebandt, A.K., H. Kusch, M. Degner, S. Jaglitz, M.J. Sibbald, J.P. Arends, M.A. Chlebowicz, D. Albrecht, R. Pantucek, J. Doškar, W. Ziebuhr, B.M. Bröker, M. Hecker, J.M. van Dijl, y S. Engelmann. 2010. Proteomics uncovers extreme heterogeneity in the Staphylococcus aureus exoproteome due to genomic plasticity and variant gene regulation. Proteomics 285(47)36794-36803.

REIVINDICACIONES

1. Un constructo de fusión de fórmula (I):

X-A-ligante-B-Z (I)

en la cual **:**

(1) A y B son idénticos o diferentes y son independientemente:

(a) un polipéptido que comprende un polipéptido SACOL0029 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en FIG. 24 (SEC ID NOs: 5 y 121 a 131), un polipéptido SACOL0264 (SEC ID NO: 185), un polipéptido SACOL0442 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en FIG. 22D (SEC ID NOs: 29 y 82 a 92), un polipéptido SACOL0718 (SEC ID NO: 186), un polipéptido SACOL0720 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en FIGs. 23I-K (SEC ID NOs: 11 y 109 a 120), un polipéptido SACOL1353 (SEC ID NO : 187), un polipéptido SACOL1416 (SEC ID NO : 188), un polipéptido SACOL1611 (SEC ID NO : 189), un polipéptido SACOL1867 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en FIG. 25D (SEC ID NOs: 152 a 164), un polipéptido SACOL1912 (SEC ID NO : 43), un polipéptido SACOL1944 (SEC ID NO : 190), un polipéptido SACOL2144 (SEC ID NO : 191), un polipéptido SACOL2365 (SEC ID NO : 192), un polipéptido SACOL2385 (SEC ID NO : 50) o un polipéptido SACOL2599 (SEC ID NO : 193), sobre la base de la nomenclatura genética del genoma COL (SACOL) de *Staphylococcus aureus* expuesto en la Secuencia de Referencia de NCBI NC_002951.2;

(b) un polipéptido codificado por un gen de un mismo operón que un gen que codifica al polipéptido de (a);

(c) un polipéptido que comprende un fragmento inmunogénico de por lo menos 13 aminoácidos consecutivos de (a) o (b);

(d) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 60% idéntica en su totalidad a la secuencia del polipéptido de

cualquiera de (a) a (c); o

(e) un polipéptido que comprende una variante inmunogénica que comprende por lo menos 13 aminoácidos consecutivos de cualquiera de (a) a (c);

(2) el ligante es una secuencia de aminoácidos de por lo menos un aminoácido o está ausente;

(3) X está ausente o es una secuencia de aminoácidos de por lo menos un aminoácido; y

(4) Z está ausente o es una secuencia de aminoácidos de por lo menos un aminoácido.

2. El constructo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque (1) (a) es un polipéptido que comprende un polipéptido SACOL0029 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en FIG. 24 (SEC ID NOs: 5 y 121 a 131), un polipéptido SACOL0442 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en FIG. 22D (SEC ID NOs: 29 y 82 a 92), un polipéptido SACOL0720 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en FIGs. 23I-K (SEC ID NOs: 11 y 109 a 120), o un polipéptido SACOL1867 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en FIG. 25D (SEC ID NOs: 152 a 164).

3. El constructo de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque al menos uno de A y B es (a) un polipéptido que comprende un polipéptido SACOL0029 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en FIG. 24 (SEC ID NOs: 5 y 121 a 131); (b) un polipéptido codificado por un gen de un mismo operón que un gen que codifica al polipéptido de (a); (c) un polipéptido que comprende un fragmento inmunogénico de por lo menos 13 aminoácidos consecutivos de (a) o (b); (d) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 60% idéntica en su totalidad a la secuencia del polipéptido de cualquiera de (a) a (c); o (e) un polipéptido que comprende una variante inmunogénica que comprende por lo menos 13 aminoácidos consecutivos de cualquiera de (a) a (c); y el otro de A y B es (a') un polipéptido que comprende un polipéptido SACOL1867 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en FIG. 25D (SEC ID NOs: 152 a 164); (b') un polipéptido codificado por un gen de un mismo operón que un gen que codifica al

polipéptido de (a'); (c') un polipéptido que comprende un fragmento inmunogénico de por lo menos 13 aminoácidos consecutivos de (a') o (b'); (d') un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 60% idéntica en su totalidad a la secuencia del polipéptido de cualquiera de (a') a (c'); o (e') un polipéptido que comprende una variante inmunogénica que comprende por lo menos 12 aminoácidos consecutivos de cualquiera de (a') a (c').

4. El constructo de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque al menos uno de A y B es (a) un polipéptido que comprende un polipéptido SACOL0442 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en FIG. 22D (SEC ID NOs: 29 y 82 a 92); (b) un polipéptido codificado por un gen de un mismo operón que un gen que codifica al polipéptido de (a); (c) un polipéptido que comprende un fragmento inmunogénico de por lo menos 13 aminoácidos consecutivos de (a) o (b); (d) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 60% idéntica en su totalidad a la secuencia del polipéptido de cualquiera de (a) a (c); o (e) un polipéptido que comprende una variante inmunogénica que comprende por lo menos 13 aminoácidos consecutivos de cualquiera de (a) a (d); y el otro de A y B es (a') un polipéptido que comprende un polipéptido SACOL0720 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en FIGs. 23I-K (SEC ID NOs: 11 y 109 a 120); (b') un polipéptido codificado por un gen de un mismo operón que un gen que codifica al polipéptido de (a'); (c') un polipéptido que comprende un fragmento inmunogénico de por lo menos 13 aminoácidos consecutivos de (a') o (b'); (d') un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 60% idéntica en su totalidad a la secuencia del polipéptido de cualquiera de (a') a (c'); o (e') un polipéptido que comprende una variante inmunogénica que comprende por lo menos 12 aminoácidos consecutivos de cualquiera de (a') a (d').
5. El constructo de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque A y B son idénticos o diferentes y son (a) un polipéptido que comprende un polipéptido SACOL0720 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en FIGs. 23I-K (SEC ID NOs: 11 y 109 a 120); (b) un polipéptido codificado por un gen de un mismo operón que un gen que codifica al polipéptido de (a); (c) un polipéptido que comprende un fragmento inmunogénico de por lo menos 13 aminoácidos consecutivos

de (a) o (b); (d) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 60% idéntica en su totalidad a la secuencia del polipéptido de cualquiera de (a) a (c); o (e) un polipéptido que comprende una variante inmunogénica que comprende por lo menos 13 aminoácidos consecutivos de cualquiera de (a) a (d).

6. El constructo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2 y 4, caracterizado porque dicho fragmento inmunogénico (d) comprende una o más de las siguientes secuencias de aminoácidos: KDTINGKSNKSRNW (SEC ID NO: 34); y KDGGKYTLESHKELQ (SEC ID NO: 1).
7. El constructo de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado porque dicho fragmento inmunogénico (d) comprende una o más de las siguientes secuencias de aminoácidos : STQNSSSVQDKQLQKVEEVPNNSEKALVKKLYDRYSKDTINGKSNKSRNWVYSERPL NENQVRIHLEGTYTVAGRVYTPKRNITLNKEVVTLKELDHIIRFAHISYGLYMGEHLPKG NIVINTKDGGKYTLESHKELQKDRENVKINTADIKNVTFKLVKSVNDIEQV (SEC ID NO: 30);
   DKQLQKVEEVPNNSEKALVKKLYDRYSKDTINGKSNKSRNWVYSERPLNENQVRIHLE GTYTVAGRVYTPKRNITLNKEVVTLKELDHIIRFAHISYGLYMGEHLPKGNIVINTK (SEC ID NO :32); y
   DKQLQKVEEVPNNSEKALVKKLYDRYSKDTINGKSNKSRNWVYSERPLNENQVRIHLE GTYTVAGRVYTPKRNITLNKEVVTLKELDHIIRFAHISYGLYMGEHLPKGNIVINTKDGG KYTLESHKELQKDRENVKINTADIKNVTFKLVKSVNDIEQV (SEC ID NO : 33).
8. El constructo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2 y 4-5, caracterizado porque dicho fragmento inmunogénico (d) comprende una o más de las siguientes secuencias de aminoácidos: QFGFDLKHKKDALA (SEC ID NO: 21); TIKDQQKANQLAS (SEC ID NO: 22); KDINKIYFMTDVDL (SEC ID NO: 23); y DVDLGGPTFVLND (SEC ID NO: 24).
9. El constructo de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado porque dicho fragmento inmunogénico (d) comprende una o más de las siguientes secuencias de aminoácidos: RASLSSEIKYTAPHDVTIKDQQKANQLASELNNQKIPHFYNYKEVIHTKLYKDNLFDVKA KEPYNVTITSDKYIPNTDLKRGQADLFVAEGSIKDLVKHKKHGKAIIGTKKHHVNIKLRK DINKIYFMTDVDLGGPTFVLNDKDYQEIRKYTKAKHIVSQFGFDLKHKKDALALEKAKN KVDKSIETRSEAISSISSLTG (SEC ID NO : 12);

ASLSSEIKYTAPHDVTIKDQQKANQLASELNNQKIPHFYNYKEVIHTKLYKDNLFDVKAK EPYNVTITSDKYIPNTDLKRGQADLFVAEGSIKDLVKHKKHGKAIIGTKKHHVNIKLRKDI NKIYFMTDVDLGGPTFVLNDKDYQEIRKYTKAKHIVSQFGFDLKHKKDALALEKAKNKV DKSIETRSEAISSISSLTG (SEC ID NO: 13); ASLSSEIKYTAPHDVTIKDQQKANQLASELNNQKIPHFYNYKEVIHTKLYKDNLFDVKAK EPYNVTITSDKYIPNTDLKRGQADLFVAEGSIKDLVKHKKHGKAIIGTKKHHVNIKLRKDI NKIYFMTDVDLGGPTFVLNDKDYQE (SEC ID NO: 14); KDINKIYFMTDVDLGGPTFVLNDKDYQEIRKYTKAKHIVSQFGFDLKHKKDALA (SEC ID NO : 15); KDINKIYFMTDVDLGGPTFVLNDKDY (SEC ID NO : 17); KDINKIYFMTDVDLGGPTFVLNDKD (SEC ID NO : 16); KDINKIYFMTDVDLGGPTFVLND (SEC ID NO : 19); KHIVSQFGFDLKHKKDALA (SEC ID NO: 20) y SQFGFDLKHKKDALA (SEC ID NO: 18).

10. El constructo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, caracterizado porque dicho fragmento inmunogénico (c') comprende una o más de las siguientes secuencias de aminoácidos: PYNGVVSFKDATGF (SEC ID NO: 165); AHPNGDKGNGGIYK (SEC ID NO: 167); SISDYPGDEDISVM (SEC ID NO: 169); RGPKGFNFNENVQA (SEC ID NO: 172); QFESTGTIKRIKDN (SEC ID NO: 175); y GNSGSPVLNSNNEV (SEC ID NO: 178).
11. El constructo de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizado porque dicho fragmento inmunogénico (d) comprende la siguiente secuencia de aminoácidos: TQVKDTNIFPYNGVVSFKDATGFVIGKNTIITNKHVSKDYKVGDRITAHPNGDKGNGGI YKIKSISDYPGDEDISVMNIEEQAVERGPKGFNFNENVQAFNFAKDAKVDDKIKVIGYPL PAQNSFKQFESTGTIKRIKDNILNFDAYIEPGNSGSPVLNSNNEVIGVVYGGIGKIGSEY NGAVYFTPQIKDFIQKHIEQ (SEC ID NO: 39).
12. El constructo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque el ligante comprende por lo menos cuatro aminoácidos idénticos o diferentes seleccionados del grupo que consiste en glicina, serina, alanina, aspartato, glutamato y lisina.
13. El constructo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque el ligante comprende (GGGGS)n (SEC ID NO: 67), (ERKYK)n (SEC ID NO: 61); o (EAAAK)n (SEC ID NO: 63), donde n=1 a 5.

14. El constructo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque dicha X comprende una polihistidina de 6 a 10 aminoácidos.
15. El constructo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque dicha X está ausente.
16. El constructo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, caracterizado porque dicha Z está ausente.
17. Una molécula de ácido nucleico aislada caracterizada porque codifica el constructo definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.
18. Un vector caracterizado porque comprende el ácido nucleico aislado definido en la reivindicación 17.
19. Una célula huésped caracterizada porque comprende el vector definido en la reivindicación 18.
20. La célula de acuerdo con la reivindicación 19, caracterizada porque es una forma viva atenuada de *Staphylococcus aureus*.
21. La célula de acuerdo con la reivindicación 20, caracterizada porque la forma atenuada viva de *Staphylococcus aureus* tiene un fenotipo de variante de colonias pequeñas (VCP) estabilizado.
22. La célula de acuerdo con la reivindicación 21, caracterizada porque la forma atenuada viva de *Staphylococcus aureus* que tiene un fenotipo VCP estabilizado es Δ*hemB*Δ720 *S. aureus*.
23. Una composición caracterizada porque comprende:

(A) al menos uno de los constructos definidos en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16; al menos una de las moléculas de ácidos nucleicos definidas en la reivindicación 17; al menos uno de los vectores definidos en la reivindicación 18; o al menos una de las células definidas en cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22; y

(B) (i) un polipéptido definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11;

(ii) un *Staphylococcus aureus* vivo atenuado;

(iii) un excipiente farmacéuticamente aceptable;

(iv) un adyuvante; o

(v) una combinación de por lo menos dos de (i) a (iv).

24. La composición de acuerdo con la reivindicación 23, caracterizada porque la forma atenuada viva de *Staphylococcus aureus* expresa:
    (a) un polipéptido que comprende un polipéptido SACOL0029 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en FIG. 24 (SEC ID NOs: 5 y 121 a 131), un polipéptido SACOL0264 (SEC ID NO: 185), un polipéptido SACOL0442 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en FIG. 22D (SEC ID NOs: 29 y 82 a 92), un polipéptido SACOL0718 (SEC ID NO: 186), un polipéptido SACOL0720 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en FIGs. 23I-J (SEC ID NOs: 11 y 109 a 120), un polipéptido SACOL1353 (SEC ID NO : 187), un polipéptido SACOL1416 (SEC ID NO : 188), SACOL1611 (SEC ID NO : 189), un polipéptido SACOL1867 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en FIG. 25D (SEC ID NOs: 152 a 164), un polipéptido SACOL1912 (SEC ID NO : 43), SACOL1944 (SEC ID NO : 190), un polipéptido SACOL2144 (SEC ID NO : 191), un polipéptido SACOL2365 (SEC ID NO : 192), un polipéptido SACOL2385 (SEC ID NO : 50) o un polipéptido SACOL2599 (SEC ID NO : 193) sobre la base de la nomenclatura genética del genoma COL (SACOL) de *Staphylococcus aureus* expuesto en la Secuencia de Referencia en el NCBI NC_002951.2;
    (b) un polipéptido codificado por un gen de un mismo operón que un gen que codifica al polipéptido de (a);
    (c) un polipéptido que comprende un fragmento inmunogénico de por lo menos 13 aminoácidos consecutivos de (a) o (b);
    (d) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 60% idéntica en su totalidad a la secuencia del polipéptido de cualquiera de (a) a (c); o
    (e) un polipéptido que comprende una variante inmunogénica que comprende por lo menos 13 aminoácidos consecutivos de cualquiera de (a) a (c).

25. La composición de acuerdo con la reivindicación 23 o 24, caracterizada porque la forma atenuada viva de *Staphylococcus aureus* tiene un fenotipo de variante de colonias pequeñas (VCP) estabilizado.

26. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25,

caracterizada porque el adyuvante comprende alumbre, un aceite, saponina, diguanosina-5'-monofosfato cíclico (c-di-GMP), polifosfasina, indolicidina, patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS), liposoma o una combinación de por lo menos dos de los mismos.

27. Un método para prevenir y/o tratar una infección intramamaria estafilocócica (IIM) en un mamífero, caracterizado porque comprende administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz del constructo definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16; de la molécula de ácido nucleico definida en la reivindicación 17; del vector definido en la reivindicación 18; de la célula definida en cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22; o de la composición definida en cualquiera de las reivindicaciones 23 a 26.
28. El método de acuerdo con la reivindicación 27, caracterizado porque dicha IIM estafilocócica es causada por una o más cepas de *Staphylococcus aureus*.
29. El método de acuerdo con la reivindicación 27 o 28, caracterizado porque dicho mamífero es una vaca.
30. El uso de una cantidad eficaz de (i) el constructo definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16; (ii) la molécula de ácido nucleico definida en la reivindicación 17; (iii) el vector definido en la reivindicación 18; de la célula definida en cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22; (iv) la composición definida en cualquiera de las reivindicaciones 23 a 26; o (v) una combinación de por lo menos dos de (i) a (iv), para prevenir y/o tratar una infección intramamaria estafilocócica (IIM) en un mamífero.
31. El uso de acuerdo con la reivindicación 30, caracterizado porque dicha IIM estafilocócica es causada por una o más cepas de *Staphylococcus aureus*.
32. El uso de acuerdo con la reivindicación 30 o 31, caracterizado porque dicho mamífero es una vaca.
33. El constructo definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16; la molécula de ácido nucleico definida en la reivindicación 17; el vector definido en la reivindicación 18; la célula definida en cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22; la composición definida en cualquiera de las reivindicaciones 23 a 26 o una combinación de por lo menos dos de los mismos, para utilizar en la prevención y/o tratamiento de una infección intramamaria estafilocócica (IIM) en un mamífero.
34. El constructo, molécula de ácido nucleico, vector, célula, composición o combinación

de acuerdo con la reivindicación 33, caracterizado porque dicha IIM estafilocócica es causada por una o más cepas de *Staphylococcus aureus*.

35. El constructo, molécula de ácido nucleico, vector, célula o composición de acuerdo con la reivindicación 33 o 34, caracterizado porque dicho mamífero es una vaca.

36. Un kit para prevenir y/o tratar una infección intramamaria estafilocócica (IIM) en un mamífero caracterizado porque comprende:

(A) (i) al menos uno de los constructos definidos en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16; (ii) al menos una de las moléculas de ácidos nucleicos definidas en la reivindicación 17; (iii) al menos uno de los vectores definidos en la reivindicación 18; (iv) al menos una de las células definidas en cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22; o (v) una combinación de por lo menos dos de (i) a (iv), y

(B) (i) el polipéptido definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11;

(ii) un *Staphylococcus aureus* vivo atenuado;

(iii) un excipiente farmacéuticamente aceptable;

(iv) un adyuvante;

(v) instrucciones para utilizar el kit para prevenir y/o tratar una infección intramamaria estafilocócica (IIM) en un mamífero; o

(vi) una combinación de por lo menos dos de (i) a (v).

RESUMEN

Se proporciona un constructo de fusión de fórmula (I): X-A-ligante-B-Z (I) donde **:** (1) A y B son idénticos o diferentes y son independientemente: (a) un polipéptido que comprende un polipéptido SACOL0029 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en FIG. 24 (SEC ID NOs: 5 y 121 a 131), un polipéptido SACOL0264 (SEC ID NO : 185), un polipéptido SACOL0442 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en FIG. 22D (SEC ID NOs: 29 y 82 a 92), un polipéptido SACOL0718 (SEC ID NO : 186), un polipéptido SACOL0720 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en FIGs. 23I-J (SEC ID NOs: 11 y 109 a 120), un polipéptido SACOL1353 (SEC ID NO : 187), un polipéptido SACOL1416 (SEC ID NO : 188), un polipéptido SACOL1611 (SEC ID NO : 189), un polipéptido SACOL1867 según lo expuesto en cualquiera de las secuencias descritas en FIG. 25D (SEC ID NOs: 152 a 164), un polipéptido SACOL1912 (SEC ID NO : 43), un polipéptido SACOL1944 (SEC ID NO : 190), un polipéptido SACOL2144 (SEC ID NO : 191), un polipéptido SACOL2365 (SEC ID NO : 192), un polipéptido SACOL2385 (SEC ID NO : 50) o un polipéptido SACOL2599 (SEC ID NO : 193), sobre la base de la nomenclatura genética del genoma COL (SACOL) de *Staphylococcus aureus* expuesto en la Secuencia de Referencia en el NCBI NC_002951.2; (b) un polipéptido codificado por un gen de un mismo operón que un gen que codifica al polipéptido de (a); (c) un polipéptido que comprende un fragmento inmunogénico de por lo menos 13 aminoácidos consecutivos de (a) o (b); (d) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 60% idéntica en su totalidad a la secuencia del polipéptido de cualquiera de (a) a (c); o (e) un polipéptido que comprende una variante inmunogénica que comprende por lo menos 13 aminoácidos consecutivos de cualquiera de (a) a (c); (2) el ligante es una secuencia de aminoácidos de por lo menos un aminoácido o está ausente; (3) X está ausente o es una secuencia de aminoácidos de por lo menos un aminoácido; y (4) Z está ausente o es una secuencia de aminoácidos de por lo menos un aminoácido. Se proporcionan además composiciones y kits que comprenden la fusión y usos de estas fusiones, composiciones y kits.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference	**FOR FURTHER ACTION**	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below
JG-14870-16		
International application No.	International filing date *(day/month/year)*	(Earliest)Priority date *(day/month/year)*
PCT/CA2017/051253	20 October 2017 (20-10-2017)	21 October 2016 (21-10-2016)

Applicant

SOCPRA SCIENCES ET GÉNIES S.E.C.

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 7 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

☑ the international application in the language in which it was filed.

☐ a translation of the international application into which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).

c. ☑ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☑ **Certain claims were found unsearchable** (see Box No. II).

3. ☑ **Unity of invention is lacking** (see Box No. III).

4. With regard to the **title**,

☑ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

☑ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the **drawings**,

a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 16

☐ as suggested by the applicant.

☑ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.

☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2017/051253

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☑ forming part of the international application as filed:

☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2017/051253

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☑ Claim Nos.: 1-36 (partially)
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

See extra sheet

3. ☐ Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
See extra sheet for a description of the groups.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☑ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claim Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2017/051253

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC: ***C07K 14/31*** (2006.01), ***A61K 39/085*** (2006.01), ***A61P 31/04*** (2006.01), ***A61P 37/04*** (2006.01), ***C07K 19/00*** (2006.01), ***C12N 1/21*** (2006.01) (more IPCs on the last page)

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Keywords used across the whole IPC

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

Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used)
Databases: Genomequest

Keywords: Search of SEQ ID NO:55 in Genomequest

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CA2758490 (BAGNOLI et al.) 21 October 2010 (21-10-2010) *see the polypeptide set forth in SEQ ID NO :117*	1-3, 10-13, 15-21 and 23-36
Y	CA2792956 (MALOUIN et al.) 22 September 2011 (22-09-2011) *see the polypeptide set forth in SEQ ID NO :78*	1-3, 10-13, 15-21 and 23-36

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

*	Special categories of cited documents:	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&"	document member of the same patent family
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search 15 December 2017 (15-12-2017)	Date of mailing of the international search report 21 December 2017 (21-12-2017)
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 819-953-2476	Authorized officer Stephanie Etchells (819) 639-7796

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CA2017/051253

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
CA2758490A1	21 October 2010 (21-10-2010)	CA2758490A1	21 October 2010 (21-10-2010)
		AU2010238255A1	03 November 2011 (03-11-2011)
		AU2010238255B2	16 October 2014 (16-10-2014)
		CN102647999A	22 August 2012 (22-08-2012)
		CO6440592A2	15 May 2012 (15-05-2012)
		CY1117230T1	05 April 2017 (05-04-2017)
		DK2510947T3	21 March 2016 (21-03-2016)
		EP2419129A2	22 February 2012 (22-02-2012)
		EP2510947A1	17 October 2012 (17-10-2012)
		EP2510947B1	10 February 2016 (10-02-2016)
		ES2565377T3	04 April 2016 (04-04-2016)
		HRP20160276T1	08 April 2016 (08-04-2016)
		HUE028803T2	30 January 2017 (30-01-2017)
		IL215593D0	29 December 2011 (29-12-2011)
		JP2012523246A	04 October 2012 (04-10-2012)
		JP5830009B2	09 December 2015 (09-12-2015)
		JP2016020390A	04 February 2016 (04-02-2016)
		JP2017193574A	26 October 2017 (26-10-2017)
		KR20120034612A	12 April 2012 (12-04-2012)
		MX2011010735A	25 January 2012 (25-01-2012)
		NZ595689A	28 March 2014 (28-03-2014)
		NZ612315A	31 October 2014 (31-10-2014)
		PH12015500092A1	02 December 2015 (02-12-2015)
		PL2510947T3	30 September 2016 (30-09-2016)
		RU2011146016A	20 May 2013 (20-05-2013)
		RU2508126C2	27 February 2014 (27-02-2014)
		RU2013154779A	20 June 2015 (20-06-2015)
		SG175092A1	28 November 2011 (28-11-2011)
		SG10201404076TA	30 October 2014 (30-10-2014)
		SI2510947T1	31 May 2016 (31-05-2016)
		SMT201600117B	01 July 2016 (01-07-2016)
		US2012093850A1	19 April 2012 (19-04-2012)
		US8632783B2	21 January 2014 (21-01-2014)
		US2012107340A1	03 May 2012 (03-05-2012)
		US8679505B2	25 March 2014 (25-03-2014)
		US2014178425A1	26 June 2014 (26-06-2014)
		US9205142B2	08 December 2015 (08-12-2015)
		US2016158335A1	09 June 2016 (09-06-2016)
		US9642904B2	09 May 2017 (09-05-2017)
		US2017340720A1	30 November 2017 (30-11-2017)
		WO2010119343A2	21 October 2010 (21-10-2010)
		WO2010119343A3	07 April 2011 (07-04-2011)
		WO2010119343A8	26 April 2012 (26-04-2012)
		ZA201302878B	23 December 2013 (23-12-2013)
CA2792956A1	22 September 2011 (22-09-2011)	CA2792956A1	22 September 2011 (22-09-2011)
		EP2547361A1	23 January 2013 (23-01-2013)
		EP2547361A4	19 March 2014 (19-03-2014)
		US2013064845A1	14 March 2013 (14-03-2013)
		US8889150B2	18 November 2014 (18-11-2014)
		US2015132335A1	14 May 2015 (14-05-2015)
		US9566322B2	14 February 2017 (14-02-2017)
		US2017095548A1	06 April 2017 (06-04-2017)
		WO2011113160A1	22 September 2011 (22-09-2011)

Continuation of: Box No. II

The International Searching Authority has not carried out a search for claim 1, under PCT Article 17(2)(b). The description, claims, and/or drawings fail to comply with the prescribed requirements to such an extent that a meaningful search could not be carried out. Claim 1 so lacks clarity and/or support that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, the search has been established for the parts of the application which appear to be clear and supported. The polypeptide of greatest interest, based on the instant description and the examples section, was determined to be the polypeptide set forth in SEQ ID NO:55 and therefore the search was limited to said polypeptide.

Continuation of: Box No. III

The claims are directed to a plurality of inventive concepts as follows:

Group A - Claims 1-3, 10-13 and 15-36 (partially) are directed to the peptide set forth in SEQ ID NO:55, its corresponding nucleic acid sequence as set forth in SEQ ID NO:54 and all vectors, host cells, compositions, kits and uses thereof;
Group B - Claims 1-3 and 10-36 (partially) are directed to the polypeptide set forth in SEQ ID NO:57, its corresponding nucleic acid sequence as set forth in SEQ ID NO:56 and all vectors, host cells, compositions, kits and uses thereof; and
Group C - Claims 1-36 (partially) are directed to a multitude of fusion constructs, their corresponding nucleic acid molecules, vectors, host cells, kits, compositions and use thereof. Group C can be subdivided into a multitude of different groups of invention, each based on a different fusion construct or group of related fusion constructs.

An *a priori* analysis has concluded that peptide epitopes from Staphylococcus aureus (NCBI reference Sequence NC_002951.2) are known in the art (see CA2758490). Additionally using said peptide epitopes in a fusion protein comprising a linker between said peptide epitopes is also known (see CA2758490), and therefore there in no common inventive concept linking the claims together. The claims must be limited to one inventive concept as set out in PCT Rule 13. As claim 1 makes reference to an infinite number of polypeptides, each and every polypeptide representing a possible inventive concept the examiner has chosen to limit the search to the polypeptide set forth in SEQ ID NO:55 as this was the peptide of greatest interest in the instant description and examples section of the instant specification. The examiner has not chosen to examine the first fusion protein mentioned since it was not made nor was its amino acid sequence disclosed.

C12N 15/31 (2006.01) , ***C12N 15/62*** (2006.01) , and ***C12N 15/63*** (2006.01)

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:
GOUDREAU GAGE DUBUC
2000 McGill College
Suite 2200
MONTREAL, Quebec
Canada, H3A 3H3

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43*bis*.1)

Date of mailing *(day/month/year)*	21 December 2017 (21-12-2017)
Applicant's or agent's file reference JG-14870-16	**FOR FURTHER ACTION** See paragraph 2 below

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/CA2017/051253	20 October 2017 (20-10-2017)	21 October 2016 (21-10-2016)

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
IPC: ***C07K 14/31*** (2006.01), ***A61K 39/085*** (2006.01), ***A61P 31/04*** (2006.01), ***A61P 37/04*** (2006.01), ***C07K 19/00*** (2006.01), ***C12N 1/21*** (2006.01) (more IPCs on the last page)

Applicant
SOCPRA SCIENCES ET GÉNIES S.E.C.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☑ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☑ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☑ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☑ Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☑ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☑ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1*bis*(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA/CA	Date of completion of this opinion	Authorized officer
Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 001-819-953-2476	21 December 2017 (21-12-2017)	Stephanie Etchells (819) 639-7796

Box No I **Basis of this opinion**

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:

☑ the international application in the language in which it was filed.

☐ a translation of the international application into which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43*bis*.1(a))

3. ☑ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing:

a. ☑ forming part of the international application as filed:

☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

5. Additional comments:

Box No. III **Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability**

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application

☑ claim Nos. 1-36 (partially)

because:

☑ the said international application, or the said claim Nos. 1-36 (partially) relate to the following subject matter which does not require an international search *(specify)*:

The International Searching Authority has not carried out a search for claims 1-36 (partially), under Article 17(2)(b) of the PCT. The description, claims, and/or drawings fail to comply with the prescribed requirements to such an extent that a meaningful search could not be carried out. Claim 1 so lacks clarity and/or support that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, the search has been established for the parts of the application which appear to be clear and supported. The polypeptide of greatest interest, based on the instant description and examples section , was determined to be the polypeptide set forth in SEQ ID NO:55 and therefore the search was limited to said polypeptide.

☐ the description, claims or drawings *(indicate particular elements below)* or said claim Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed *(specify)*:

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed *(specify):*

☐ no international search report has been established for said claims Nos.

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

- ☐ furnish a sequence listing in the form of an Annex C/ST.25 text file, and such listing was not available to the International Searching Authority in the form and manner acceptable to it; or the sequence listing furnished did not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions.
- ☐ furnish a sequence listing on paper or in the form of an image file complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in the form and manner acceptable to it; or the sequence listing furnished did not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions.
- ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rule 13*ter*.1(a) or (b).

☐ See Supplemental Box for further details.

Box No. IV **Lack of unity of invention**

1. ☐ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees the applicant has, within the applicable time limit:

   ☐ paid additional fees

   ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee

   ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid

   ☐ not paid additional fees

2. ☑ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

   ☐ complied with.

   ☑ not complied with for the following reasons:

The claims are directed to a plurality of inventive concepts as follows:

Group A - Claims 1-3, 10-13 and 15-36 (partially) are directed to the peptide set forth in SEQ ID NO:55, its corresponding nucleic acid sequence as set forth in SEQ ID NO:54 and all vectors, host cells, compositions, kits and uses thereof;
Group B - Claims 1-3 and 10-36 (partially) are directed to the polypeptide set forth in SEQ ID NO:57, its corresponding nucleic acid sequence as set forth in SEQ ID NO:56 and all vectors, host cells, compositions, kits and uses thereof; and
Group C - Claims 1-36 (partially) are directed to a multitude of fusion constructs, their corresponding nucleic acid molecules, vectors, host cells, kits, compositions and use thereof. Group C can be subdivided into a multitude of different groups of invention, each based on a different fusion construct or group of related fusion constructs.

An *a priori* analysis has concluded that peptide epitopes from Staphylococcus aureus (NCBI reference Sequence NC_002951.2) are known in the art (see CA2758490). Additionally using said peptide epitopes in a fusion protein comprising a linker between said peptide epitopes is also known (see CA2758490), and therefore there in no common inventive concept linking the claims together. The claims must be limited to one inventive concept as set out in PCT Rule 13. As claim 1 makes reference to an infinite number of polypeptides, each and every polypeptide representing a possible inventive concept the examiner has chosen to limit the search to the polypeptide set forth in SEQ ID NO:55 as this was the peptide of greatest interest in the instant description and examples section of the instant specification. The examiner has not chosen to examine the first fusion protein mentioned since it was not made nor was its amino acid sequence disclosed.

The claims must be limited to one inventive concept as set out in PCT Rule 13.

4. Consequently, this opinion has been established in respect of the following parts of the international application:

   ☐ all parts.

   ☑ the parts relating to claim Nos. 1-3, 10-13 and 15-36 (all partially)

Box No. V **Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-3, 10-13 and 15-36 (partially)	YES
	Claims	NONE	NO
Inventive step (IS)	Claims	22(partially)	YES
	Claims	1-3, 10-13, 15-21 and 23-36 (partially)	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-3, 10-13 and 15-36 (partially)	YES
	Claims	NONE	NO

2. Citations and explanations:

Reference is made to the following documents:

D1 CA2758490 (BAGNOLI et al.) 21 October 2010 (21-10-2010),
D2 CA2792956 (MALOUIN et al.) 22 September 2011 (22-09-2011),
\

Group A Claims 1-3, 10-13 and 15-36 (partially)

Novelty

Claims 1-3, 10-13 and 15-36 (partially) are novel and therefore comply with PCT Article 33(2). Document D1 is considered to represent the closest prior art. Document D1 discloses a polypeptide as set forth in SEQ ID NO:117 which has 76.12% sequence identity with the polypeptide set forth in SEQ ID NO:55 of the instant application.. However, none of the cited documents discloses the polypeptide set forth in SEQ ID NO:55 or its corresponding nucleic acid sequence as set forth in SEQ ID NO:54. Claims 1-3, 10-13 and 15-36 (partially) are therefore novel.

Continued in Supplemental Box.

Box No. VII Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

There are two errors in the instant application. In paragraph 00214 of the instant application the phrase "(see sequence in FIG.21I, Item VII fusions)" appears which leads to the conclusion that SEQ ID NO:55 is found in Figure 21I when in fact it is found in Figure 21H, Item VII. Additionally in paragraph 00216, specifically table IV the table subheading states that the epitopes are in bold and the linker sequence is italicized. This leads to confusion as the epitopes in SACOL0029 are not in bold nor are all the epitopes found in SACOL1867.

In claim 10, reference is made to the immunogenic fragment (c') of claim 1-3, however, there is no (c') in claims 1-3.

In claim 11 reference is made to the immunogenic fragment (d) however this leads to confusion when claim 11 depends on claim 1 as claim 1 reference character (d) does not relate to an immunogenic fragment.

In claim 30 there is a clerical error. The fourth element is not numbered. The phrase "(iii) the vector defined in claim 18; of the cell defined in any one of claims 19 to 22" should read "(iii) the vector defined in claim 18; (iv) the cell defined in any one of claims 19 to 22". Moreover, elements "(iv)" and "(v)" should be renumbered as "(v)" and "(vi)" respectively. Finally the last element {renumbered as (vi) instead of (v)} which is directed to a "combination of at least two of (i) to (iv)" should read "combination of at least two of (i) to (v)".

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

Claims 27-36 (partially) do not comply with PCT Article 6. These claims are not fully supported by the description. Specifically, There is no substantive support for the fusion construct set forth in SEQ ID NO:55 or its corresponding nucleic acid sequences set forth in SEQ ID NO:54 to prevent or treat a Staphylococcus intramammary infection on its own the instant description always uses said fusion construct in combination with two other known epitopes or a live attenuated form of *Staphylococcus aureus* as shown in Figure 16 of the instant description.

Claims 1-3 and 24 do not comply with PCT Rule 6.2(a) PCT. Reference is made to the drawings for completeness and clarity, rather than claiming the subject matter in explicit terms.

Claims 23 and 36 (partially) do not comply with PCT Article 6. Elements (B) (i) and (B) (ii) of these claims are already included in the list of elements defined in element (A). For example, the list of elements in part (A) comprise "at least one of the constructs defined in any one of claims 1 to 16", however, the constructs already contain element (B)(i)which is "a polypeptide defined in any one of claims 1 to 11". Does the applicant mean that the composition of claim 23 or the kit of claim 36 contains two identical polypeptides, one as part of a fusion construct and one in a free form? Similarly; part (A) comprises "at least one of the cells defined in any one of claims 19 to 22", however, claim 20 is specifically directed to a live attenuated form of Staphylococcus aureus, which is exactly the element defined in (B)(ii). Does the applicant mean there are two different live attenuated S. aureus in the composition of claim 23 or the kit of claim 36?

Supplemental Box

In case **the space in any of the preceding boxes is not sufficient.**

Continuation of: Box No.V

Inventive Step

Claims 1-3 and 10-13, 15-21 and 23-36 (partially) do not involve an inventive step and therefore do not comply with PCT Article 33(3).

Claim 1 (partially) is directed to the polypeptide set forth in SEQ ID NO:55. This polypeptide fits the general formula X-A-linker-B-Z of claim 1, wherein X is absent, A is the polypeptide set forth in SEQ ID NO:7 of the instant application, the linker sequence is represented by $(GGGGS)_3$, B is represented by the polypeptide set forth in SEQ ID NO:39 and Z is absent. Document D1 discloses a polypeptide set forth in SEQ ID NO:117 which comprises the polypeptide epitope set forth in SEQ ID NO:39 of the instant application with 100% sequence identity. Moreover the polypeptide set forth in SEQ ID NO:117 of D1 has 76.12% identity with the polypeptide set forth in SEQ ID NO:55 of the instant application. Additionally D1 discloses the use of said polypeptide epitope as set forth in SEQ ID NO:117 in a fusion polypeptides comprising the formula NH_2-A-$\{X\text{-}L\}_n$-B-COOH wherein for each *n* instances of {X-L} the linker may be present or absent (see page 87 of D1 and original claim 10 of D1) Thus the formula NH_2-A-X_1-L_1-X_2-B-COOH is disclosed as is the formula NH_2-X_1-L_1-X_2-COOH (see page 87 lines 18 and 19 of D1). Further, D1 discloses suitable linkers comprising multiple GSGGGG sequences (see page 87, lines 24-28 of D1). Finally D1 discloses that the N-terminal portion of the polypeptide set forth in SEQ ID NO:117 which does not contain the amino acid sequence that is 100% identical to the polypeptide set forth in SEQ ID NO:39 of the instant application, can be removed.

Document D2 discloses a polypeptide set forth in SEQ ID NO:78 which has 100% sequence identity with the polypeptide epitope set forth in SEQ ID NOS:5 and 7 of the instant application. D2 also discloses using alum in a vaccine preparation (see page 19 paragraph 0080 of D2). Additionally D2 discloses a Δ720 S. aureus strain from ATCC29213 in Figure 10B of D2.

It would have required no inventive effort on the part of one skilled in the art to use the known *staphylococcus aureus* epitopes set forth in SEQ ID NOS:7 and 39 in the formula of D1 to arrive at the polypeptide set forth in SEQ ID NO:55. Additionally it would have been obvious to use said polypeptide in a composition, an isolated nucleic acid molecule, a vector, a host cell, a kit, a method for preventing or treating a Staphylococcal intramammary infection in a cow and related uses. It would have been obvious to a person skilled in the art to arrive at the matter defined in claims 1-3, 10-13, 15-21 and 23-36 (partially) by combining the teachings of documents D1 and D2. Documents D1 and D2 therefore show that claims 1-3, 10-13, 15-21 and 23-36 (partially) do not involve an inventive step.

Claim 22 involves an inventive step and therefore complies with PCT Article 33(3). The live attenuated form of Staphylococcus aureus having a stabilized SCV phenotype is a ΔhemBΔ720 *S. aureus* comprising the vector comprising the DNA encoding the polypeptide set forth as set forth in SEQ ID NO:55 would not have been obvious to a person skilled in the art from the cited documents, when taken individually or in any combination. Claim 22 therefore involves an inventive step.

Industrial Applicability

The subject matter of claims 1-3, 10-13 and 15-36 (partially) is considered to be industrially applicable and thus complies with the requirements of PCT Article 33(4).

Claims 27-29 relate to a subject matter considered to be a method of medical treatment. Of note, some jurisdictions, such as Canada, do not recognize the patentability of claims to methods of medical treatment; they may, however, permit claims directed to a product, particularly substances or compositions, as well as claims directed to the contemplated medical use of said product.

Supplemental Box

In case **the space in any of the preceding boxes is not sufficient.**

Continuation of: Coversheet (International Patent Classification)

C12N 15/31 (2006.01) , ***C12N 15/62*** (2006.01) , and ***C12N 15/63*** (2006.01)