(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 769 425**

(51) Int. CI.:

A61K 39/085 (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2011 E 16193095 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2019 EP 3150222**

(54) Título: **Composiciones inmunogénicas estables de antígenos de Staphylococcus aureus**

(30) Prioridad:

22.12.2010 US 201061426476 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.06.2020

(73) Titular/es:

WYETH LLC (100.0%)
235 East 42nd Street
New York, NY 10017-5755, US

(72) Inventor/es:

KHANDKE, LAKSHMI;
NONOYAMA, AKIHISA;
HODGE, TAMARA SHAFER y
NEMA, SANDEEP

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones inmunogénicas estables de antígenos de *Staphylococcus aureus*

Antecedentes de la invención

Los seres humanos son los reservorios naturales para el *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Las personas sanas pueden estar colonizadas por S. *aureus* en la piel, en las fosas nasales y en la garganta ya sea de forma persistente (10-35 %), de forma intermitente (20-75 %) o estar en un estado de no-portador (5-70 %) sin ninguna enfermedad asociada. Véase Vandenbergh y col., *J. Clin. Micro*. 37:3133-3140 (1999). Posteriormente, la enfermedad se produce cuando los individuos se convierten en inmunocomprometidos debido a alteraciones de las barreras inmunitarias, tales como durante la cirugía, la colocación de catéteres permanentes u otros dispositivos, traumatismos o heridas. La infección por *S. aureus* resultante puede provocar una amplia gama de enfermedades que varían desde infecciones leves de la piel a endocarditis, osteomielitis, bacteriemia, sepsis y otras formas de enfermedad acompañadas de altas tasas de mortalidad. El gran reservorio humano potencia la oportunidad para la evolución y la propagación de tipos clonales patógenos adaptados.

Las infecciones estafilocócicas invasivas de los cocos grampositivos *S. aureus* y *S. epidermidis* son de particular interés debido a que son un problema creciente de salud pública en todo el mundo. En concreto, *S. aureus* es responsable de la mayoría de las infecciones intrahospitalarias (nosocomiales) y su prevalencia en infecciones extrahospitalarias va en aumento. Por ejemplo, la incidencia de *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM) invasivo se estimó en 31,8 por cada 100.000 personas, incluyendo 18.650 muertes en los Estados Unidos en 2005. Véase Klevens R.M. y col., *JAMA*, 298:1763-1771 (2007).

Las enfermedades estafilocócicas se han visto aumentadas drásticamente en los últimos 20 años; este aumento es paralelo al uso de dispositivos intravasculares y a procedimientos invasivos. El aumento de la incidencia de la enfermedad se hace más preocupante debido al aumento paralelo de la resistencia a los antibióticos; por tanto, existe una necesidad urgente de composiciones inmunogénicas para su uso en vacunas o para inducir anticuerpos policlonales o monoclonales para conferir inmunidad pasiva como medio para prevenir o tratar la infección por estafilococos y enfermedades asociadas.

El factor aglutinante A (ClfA) es una adhesina asociada a la pared celular de *S. aureus* que media la unión estafilocócica al fibrinógeno y las plaquetas. Se expresa en la superficie celular de la bacteria, donde se cree que promueve la patogenia mediante la unión al fibrinógeno y la fibrina que se deposita en el sitio del daño tisular. ClfA está bien conservado e incluso la forma más diversa (~85 % de identidad) presenta una extensa reactividad cruzada con anticuerpos tanto monoclonales como policlonales. Por tanto, ClfA es un candidato razonable para ser un componente de una vacuna contra *S. aureus.* Sin embargo, dada la inestabilidad estructural de ClfA, una formulación de ClfA es problemática ya que puede degradarse fácilmente durante el tiempo de almacenamiento.

El ClfA de longitud completa comprende varias regiones y dominios: un dominio secretor N-terminal (dominio "S"); seguido de una región A de unión a ligando, que contiene tres dominios (N1, N2, que contiene un motivo de mano EF y N3); seguido de una región R, que contiene repeticiones de dipéptidos serina-aspartato; seguido de una región de unión a la pared celular (región "W") que contiene un motivo LPXTG; un dominio hidrófobo transmembrana (región "M"); y un extremo C cargado (región "C") que contiene aminoácidos cargados positivamente. La región N1 contiene un sitio sensible a la proteasa. Gran parte de la inestabilidad de ClfA se atribuye a la aglutinación de ClfA en N1, que da como resultado fragmentos que contienen N1 y N2N3. La estructura y función de ClfA se desvela en la Publicación de la Solicitud de Patente de los EE.UU. N.º 20070087014A1 (Pavliak y col., 19 de Abril, 2007).

Los microorganismos estafilocócicos capaces de provocar una enfermedad invasiva generalmente también son capaces de producir un polisacárido capsular (PC) que encapsula la bacteria y potencia su resistencia a la eliminación por el sistema inmunitario innato del hospedador. El PC sirve para cubrir la célula bacteriana con una cápsula protectora que vuelve a las bacterias resistentes a la fagocitosis y a la destrucción intracelular. Las bacterias que carecen de una cápsula son más susceptibles a la fagocitosis. Los polisacáridos capsulares son con frecuencia un factor de virulencia importante para muchos patógenos bacterianos, incluyendo *Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae* y estreptococos del grupo B.

La mayoría de los aislados clínicos de *S. aureus* están encapsulados ya sea con los serotipos 5 u 8. Los polisacáridos capsulares de tipo 5 (PC5) y de tipo 8 (PC8) tienen unidades de repetición de trisacáridos similares compuestas de ácido N-acetil manosaminurónico, N-acetil L-fucosamina y N-acetil D-fucosamina. Véase Fournier, J.M. y col., *Infect. Immun*. 45:97-93 (1984) y Moreau, M. y col., *Carbohydrate Res*. 201:285-297

(1990). Los dos PC, que tienen los mismos azúcares, pero difieren en los enlaces de azúcar y en los sitios de O-acetilación, producen cada uno patrones de inmunorreactividad serológicamente distintos.

La proteína MntC de *S. aureus* (también conocida como Proteína 305, P305, P305A y ORF305) es un componente de un transportador ABC de manganeso. Esta proteína se expresa *in vivo.* El *S. aureus* utiliza manganeso como cofactor para una enzima que potencia la supervivencia del *S. aureus* en los neutrófilos. MntC es, por tanto, importante para la supervivencia *in vivo* de *S. aureus* durante la infección. Como ClfA, esta proteína también es

inestable en solución. Sin embargo, a diferencia de ClfA, que puede agregarse o cortarse por medio de hidrólisis, el mecanismo principal de la degradación de MntC es la desamidación cuando se somete a pH básico y/o a una temperatura de alrededor de la temperatura ambiente (aproximadamente 25 ºC) o superior.
El documento WO2007113222 se refiere a composiciones inmunogénicas que comprenden el polisacárido u oligosacárido capsular de Tipo 5 y/u 8 de *S. aureus* que tiene O-acetilación entre el 30-100 %.

En consecuencia, existe una necesidad urgente no solo de vacunas contra la infección por *S. aureus,* sino en particular de vacunas con una estabilidad antigénica potenciada.

Sumario de la invención

La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones y/o ejemplos de la siguiente descripción que no están abarcados por las reivindicaciones adjuntas se consideran que no son parte de la presente invención. La presente invención se refiere a una composición inmunogénica reconstituida de múltiples antígenos como se define en las reivindicaciones adjuntas. Los antígenos, que son polipéptidos y polisacáridos, pueden obtenerse, entre otras cosas, directamente de la bacteria utilizando procedimientos de aislamiento conocidos por los expertos en la materia o pueden producirse utilizando protocolos de síntesis, o pueden producirse de forma recombinante utilizando procedimientos de ingeniería genética también conocidos por los expertos en la materia, o por medio de una combinación de cualquiera de los anteriores. La composición inmunogénica reconstituida de la invención comprende un factor aglutinante A (ClfA) de *S.* aureus aislado. En ciertas realizaciones, la composición inmunogénica reconstituida de la invención comprende un polipéptido factor aglutinante A (ClfA) de *S.* aureus aislado, un factor aglutinante B (ClfB) de *S.* aureus aislado, un polisacárido capsular de tipo 5 (PC5) de *S. aureus* conjugado a una proteína vehículo, un polisacárido capsular de tipo 8 (PC8) de *S. aureus* conjugado a una proteína vehículo y una proteína MntC de *S. aureus* aislada. Además, la presente divulgación proporciona procedimientos para inducir una respuesta inmunitaria contra una bacteria estafilocócica; procedimientos para prevenir, reducir la gravedad o retrasar la aparición de una enfermedad provocada por una bacteria estafilocócica; y procedimientos para prevenir, reducir la gravedad o retrasar la aparición de al menos un síntoma de una enfermedad provocada por la infección con una bacteria estafilocócica.

En consecuencia, la invención proporciona una composición inmunogénica reconstituida que comprende: un polipéptido factor aglutinante A (ClfA) de *S.* aureus aislado, un polisacárido capsular de tipo 5 (PC5) de *S. aureus* conjugado a una proteína vehículo y un polisacárido capsular de tipo 8 (PC8) de *S. aureus* conjugado a una proteína vehículo.

En una realización, la invención proporciona una composición inmunogénica reconstituida que comprende: un polipéptido factor aglutinante A (ClfA) de *S.* aureus aislado, un factor aglutinante B (ClfB) de *S.* aureus aislado, una proteína MntC de *S. aureus* aislada, un polisacárido capsular de tipo 5 (PC5) de *S. aureus* conjugado a una proteína vehículo y un polisacárido capsular de tipo 8 (PC8) de *S. aureus* conjugado a una proteína vehículo.

En una realización, la invención proporciona una composición inmunogénica reconstituida que comprende: un polipéptido factor aglutinante A (ClfA) de *S.* aureus aislado, una proteína MntC de *S. aureus* aislada, un polisacárido capsular de tipo 5 (PC5) de *S. aureus* conjugado a una proteína vehículo y un polisacárido capsular de tipo 8 (PC8) de *S. aureus* conjugado a una proteína vehículo.

La divulgación proporciona una composición inmunogénica liofilizada que comprende: (a) al menos tres componentes seleccionados entre el grupo que consiste en un polipéptido factor aglutinante A ("ClfA") de Staphylococcus aureus aislado, un polipéptido factor aglutinante B ("ClfB") de Staphylococcus aureus aislado, un conjugado polisacárido capsular de tipo 5 (PC5)-proteína, un conjugado polisacárido capsular de tipo 8 (PC8)-proteína y un polipéptido MntC de Staphylococcus aureus aislado; (b) un tampón que tiene un pKa de 6,0 ± 0,6 y (c) un agente de carga. En ciertas realizaciones, el polipéptido ClfA permanece sustancialmente sin degradarse durante al menos 1 mes a 37 ºC.

La divulgación proporciona una composición inmunogénica liofilizada que comprende: (a) un polipéptido factor aglutinante A ("ClfA") de Staphylococcus aureus aislado, (b) un conjugado polisacárido capsular de tipo 5 (PC5)-proteína, (c) un conjugado polisacárido capsular de tipo 8 (PC8)-proteína, (d) un tampón que tiene un pKa de 6,0 ± 0,6 y (e) un agente de carga. En ciertas realizaciones, el polipéptido ClfA permanece sustancialmente sin degradarse durante al menos 1 mes a 37 ºC.

En una realización, la composición inmunogénica liofilizada comprende agua a menos del 3 por ciento en peso del peso total de la composición inmunogénica (% p/p), en la que el polipéptido ClfA está entre el 0,09 % ± el 0,027 % y el 0,85 % ± el 0,26 % p/p, el conjugado PC5-proteína está entre el 0,04 % ± el 0,013 % y el 0,42 ± el 0,13 % p/p, el conjugado PC8-proteína está entre el 0,04 % ± el 0,013 % y el 0,42 ± el 0,13 % p/p y el tampón está entre el 2,54 % ± el 0,76 % p/p.

La divulgación proporciona además una composición inmunogénica liofilizada que comprende: (a) un polipéptido ClfA; (b) un conjugado PC5-proteína; (c) un conjugado PC8-proteína; (d) un tampón de histidina, pH 6,0 ± 0,5; (e) sacarosa; (f) polisorbato 80; y (g) agua. En ciertas realizaciones, el polipéptido ClfA permanece sustancialmente sin degradar durante al menos 3 meses a 37 ºC.

La divulgación proporciona además una composición inmunogénica liofilizada que comprende: (a) un polipéptido ClfA entre el 0,09 % ± el 0,027 % y el 0,85 % ± el 0,26 % p/p; (b) un conjugado PC5-proteína entre el 0,04 % ± el 0,013 % y el 0,42 ± el 0,13 % p/p; (c) un conjugado PC8-proteína entre el 0,04 % ± el 0,013 % y el 0,42 ± el 0,13 % p/p; (d) un tampón de histidina, pH 6,0 ± 0,5, al 2,54 % ± el 0,76 % p/p; (e) sacarosa al 97 % ± el 2,0 % p/p; (f) polisorbato 80 al 0,21 % ± el 0,04 % p/p; y (g) agua al 2 % ± el 1 % p/p.

La divulgación proporciona además una composición de tri-antígeno inmunogénica líquida fabricada por reconstitución de una composición inmunogénica liofilizada de la divulgación en un diluyente acuoso, teniendo dicha composición reconstituida un pH final de 6,0 ± 0,5.

La divulgación proporciona además una composición inmunogénica líquida fabricado por reconstitución de una composición inmunogénica liofilizada de la invención que comprende: (a) el polipéptido ClfA a una concentración de entre 40 µg/ml ± 4 µg/ml y 800 µg/ml ± 80 µg/ml; (b) el conjugado PC5-proteína a una concentración de entre 20 µg/ml ± 2 µg/ml y 400 µg/ml ± 40 µg/ml; (c) el conjugado PC8-proteína a una concentración de entre 20 µg/ml ± 2 µg/ml y 400 µg/ml ± 40 µg/ml; (d) el tampón de histidina a una concentración de 10 mM ± 5 mM; (e) polisorbato 80 a una concentración del 0,1 % ± el 0,05 % en peso a volumen (p/v); y (f) sacarosa a una concentración del 9 % ± el 4,5 % p/v. En otra realización, el polisorbato 80 está a una concentración del 0,01 % ± el 0,005 % en peso a volumen (p/v) y la sacarosa está a una concentración del 4,5 % ± el 1,5 % p/v.

La divulgación proporciona además una composición inmunogénica líquida que comprende: (a) un polipéptido ClfA liofilizado reconstituido; (b) un conjugado PC5-proteína; (c) un conjugado PC8-proteína; (d) un tampón de histidina, pH 6,0 ± 0,5; (e) polisorbato 80; (f) sacarosa; y (g) un diluyente acuoso.

La divulgación proporciona además una composición inmunogénica líquida fabricada por reconstitución de una composición inmunogénica liofilizada de la invención que comprende: (a) el polipéptido ClfA liofilizado reconstituido a una concentración de entre 40 µg/ml ± 4 µg/ml y 800 µg/ml ± 80µg/ml; (b) el conjugado PC5-proteína en una concentración de entre 20 µg/ml ± 2 µg/ml y 400 µg/ml ± 40 µg/ml; (c) el conjugado PC8-proteína a una concentración de entre 20 µg/ml ± 2 µg/ml y 400 µg/ml ± 40 µg/ml; (d) el tampón de histidina a una concentración de 10 mM ± 5 mM; (e) polisorbato 80 a una concentración del 0,1 % ± el 0,05 % en peso a volumen (p/v); (f) sacarosa a una concentración del 9 % ± el 4,5 % p/v; y (g) un diluyente acuoso. En otra realización, el polisorbato 80 está a una concentración del 0,01 % ± el 0,005 % en peso a volumen (p/v) y la sacarosa está a una concentración del 4,5 % ± el 1,5 % p/v.

La divulgación proporciona además un procedimiento de fabricación de una composición inmunogénica que comprende las etapas de: (a) combinar una solución acuosa que comprende: (i) un polipéptido ClfA, (ii) un conjugado PC5-proteína, (iii) un conjugado PC8-proteína, (iv) un tampón que tiene un pKa de 6,0 ± 0,6 y (v) un agente de carga; y (b) liofilizar la combinación de la etapa (a) para formar una torta que comprende menos del 3 por ciento de agua en peso. En ciertas realizaciones, el procedimiento comprende adicionalmente combinar (vi) un tensioactivo, en la etapa (a). En ciertas realizaciones, el procedimiento comprende adicionalmente una etapa de esterilización por filtrado de la combinación de la etapa (a) antes de la liofilización de la etapa (b). En ciertas realizaciones, la solución acuosa comprende histidina 10 mM ± 1 mM, pH 6,0 ± 0,5, sacarosa al 9 % ± 4,5 % p/v y polisorbato 80 al 0,1 % ± el 0,05 % p/v. En otra realización, el polisorbato 80 está a una concentración del 0,01 % ± el 0,005 % p/v y la sacarosa está a una concentración del 4,5 % ± el 1,5 % p/v.

En ciertas realizaciones, la etapa de liofilización (b) comprende las etapas de: (i) congelar la combinación esterilizada de la etapa (a) a una velocidad de 0,3 ºC ± 0,03 ºC por minuto hasta alcanzar una temperatura de -50 ºC ± 5 ºC a una presión de 40 kPa (400 mbar) 4 kPa (40 mbar); y después mantener la combinación a -50C ± 5 ºC durante 60 minutos ± 6 minutos; (ii) recocer la combinación mediante el aumento de la temperatura a -10 ºC ± 5 ºC a una velocidad de 0,3 ºC ± 0,03 ºC por minuto; posteriormente mantener la temperatura a -10 ºC ± 5 ºC durante 120 minutos ± 12 minutos, seguido de la disminución de la temperatura a una velocidad de 0,3 ºC ± 0,03 ºC por minuto hasta alcanzar una temperatura de-50 ºC ± 5 ºC y manteniendo la temperatura a -50ºC ± 5 ºC durante 180 minutos ± 18 minutos; (iii) secar la combinación disminuyendo la presión a 50 mTorr (6,65 Pa) y manteniendo durante 30 minutos, seguido del aumento de la temperatura a -30 ºC ± 5 ºC a una velocidad de 0,2 ºC ± 0,02 ºC por minuto, y, posteriormente, manteniendo la temperatura a -30 ºC ± 5 ºC durante 1.920 minutos ± 192 minutos; (iv) secar adicionalmente la combinación mediante el aumento de la temperatura a 30 ºC ± 5 ºC a una velocidad de 0,2 ºC ± 0,02 ºC por minuto y aumentando la presión a 200 mTorr (26,60 Pa), y, posteriormente, manteniendo la temperatura a 30 ºC ± 5 ºC durante 720 minutos ± 72 minutos; y (v) disminuir la temperatura a 5 ºC ± 5 ºC a una velocidad de 0,5 ºC ± 0,05 ºC por minuto. En algunas realizaciones, la liofilización se realiza en un vial. En algunas realizaciones, el vial se tapa después de la liofilización. En ciertas realizaciones, el vial se rellena con gas nitrógeno antes del tapado del vial. En ciertas realizaciones, el procedimiento comprende además la etapa de: (c) reconstituir la combinación liofilizada de la etapa (b) en un medio acuoso. En ciertas realizaciones, la osmolalidad de la combinación reconstituido de la etapa (c) es de entre 250 mOsM ± 25 mOsM y 300 mOsM ± 30 mOsM. En ciertas realizaciones, una composición inmunogénica de la divulgación se fabrica de acuerdo con cualquier procedimiento de fabricación de una composición inmunogénica de la divulgación.

La divulgación proporciona además una composición inmunogénica liofilizada que comprende: (a) al menos cuatro componentes seleccionados entre el grupo que consiste en un polipéptido factor aglutinante A (ClfA) de

Staphylococcus aureus aislado, un polipéptido factor aglutinante B (ClfB) de *Staphylococcus aureus* aislado, un conjugado PC5-proteína, un conjugado PC8-proteína y un polipéptido MntC de *Staphylococcus aureus* aislado; (b) un tampón que tiene un pKa de 6,0 ± 0,6 y (c) un agente de carga. En ciertas realizaciones, el polipéptido ClfA permanece sustancialmente sin degradar durante al menos 1 mes a 37 ºC.

La divulgación proporciona además una composición inmunogénica liofilizada que comprende: (a) un polipéptido factor aglutinante A (ClfA) de *Staphylococcus aureus* aislado; (b) un polisacárido capsular de tipo 5 conjugado a CRM_{197} (PC5-CRM_{197}); (c) un polisacárido capsular de tipo 8 conjugado a CRM_{197} (PC8-CRM_{197}); (d) un polipéptido MntC aislado; (e) un tampón que tiene un pKa de 6,0 ± 0,6 y (f) un agente de carga. En ciertas realizaciones, el polipéptido ClfA permanece sustancialmente sin degradar durante al menos 1 mes a 37 ºC.

La divulgación proporciona además una composición inmunogénica liofilizada que comprende: agua a menos del 3 por ciento en peso del peso total de la composición inmunogénica (% p/p), en la que el polipéptido ClfA está entre el 0,09 % ± el 0,027 % y el 0,84 % ± el 0,25 % p/p, el PC5-CRM_{197} está entre el 0,04 % ± el 0,013 % y el 0,42 ± el 0,13 % p/p, el PC8-CRM_{197} está entre el 0,04 % ± el 0,013 % y el 0,42 ± el 0,13 % p/p, el MntC está entre el 0,09 % ± el 0,027 % y el 0,84 % ± el 0,25 % p/p y el tampón está al 3,3 % ± el 0,99 % p/p.

La divulgación proporciona además una composición inmunogénica liofilizada que comprende: (a) un polipéptido ClfA; (b) un conjugado PC5-CRM;$_{197}$ (c) un conjugado PC8-CRM_{197}; (d) un polipéptido MntC; (e) un tampón de histidina; (f) sacarosa; (g) polisorbato 80; y (h) agua. En ciertas realizaciones, el polipéptido ClfA permanece sustancialmente sin degradar durante al menos 3 meses a 37 ºC.

La divulgación proporciona además una composición inmunogénica liofilizada que comprende: (a) un polipéptido ClfA entre el 0,09 % ± el 0,027 % y el 0,84 % ± el 0,25 % p/p; (b) un conjugado PC5-CRM_{197} entre el 0,04 % ± el 0,013 % y el 0,42 ± 0,13 % p/p; (c) un conjugado PC8-CRM_{197} entre el 0,04 % ± el 0,013 % y el 0,42 ± el 0,13 % p/p; (d) un polipéptido MntC entre el 0,09 % ± el 0,027 % y el 0,84 % ± el 0,25 % p/p; (e) un tampón de histidina al 3,3 % ± el 0,99 % p/p; (f) sacarosa al 95 % ± el 2 % p/p; (g) polisorbato 80 al 0,21 % ± el 0,063 % p/p; y (h) agua al 2 % ± el 1 % p/p. En ciertas realizaciones, el polipéptido ClfA permanece sustancialmente sin degradar durante al menos 3 meses a 37 ºC.

La divulgación proporciona además una composición de tetra-antígeno inmunogénica líquida fabricada por reconstitución de una composición inmunogénica liofilizada de la invención en un diluyente acuoso, teniendo dicha composición reconstituida un pH final de 6,5 ± 0,5.

La divulgación proporciona además una composición inmunogénica líquida que comprende: (a) el polipéptido ClfA a una concentración de entre 40 µg/ml ± 4 µg/ml y 800 µg/ml ± 80 µg/ml; (b) el conjugado PC5-CRM_{197} a una concentración de entre 20 µg/ml ± 2 µg/ml y 400 µg/ml ± 40 µg/ml; (c) el conjugado PC8-CRM_{197} a una concentración de entre 20 µg/ml ± 2 µg/ml y 400 µg/ml ± 40 µg/ml; (d) el polipéptido MntC aislado a una concentración de entre 40 µg/ml ± 4 µg/ml y 800 µg/ml ± 80 µg/ml; (e) el tampón de histidina a una concentración de 10 mM ± 5 mM; (f) polisorbato 80 a una concentración del 0,01 % ± el 0,005 % en peso a volumen (p/v); y (g) de sacarosa a una concentración del 4,5 % ± el 1,5 % p/v. En otra realización, el polisorbato 80 está a una concentración del 0,01 % ± el 0,005 % p/v y la sacarosa está a una concentración del 4,5 % ± el 1,5 % p/v.

La divulgación proporciona una composición que comprende inmunogénica líquido: (a) un polipéptido ClfA liofilizado reconstituido; (b) unPC5-CRM;$_{197}$ conjugado de (c) un PC8-CRM_{197} conjugado; (d) un polipéptido MntC; (d) un tampón de histidina; (e) de polisorbato 80; (f) de sacarosa; y (g) un diluyente acuoso.

En una realización, la invención proporciona una composición inmunogénica líquida que comprende: (a) el polipéptido ClfA liofilizado reconstituido a una concentración de entre 40 g/ml ± 800 microgramos 4 mg/ml y/ml ± 80µg/ml; (b) elPC5- CRM_{197} conjugado a una concentración de entre 20 microgramos/ml ± 2µg/ml y 400 microgramos/ml ± 40µg/ml; (c) el PC8-CRM_{197} conjugado a una concentración de entre 20 microgramos/ml ± 20 microgramos/ml y 400 microgramos/ml ± 40µg/ml; (d) el polipéptido aislado MntC a una concentración de entre 40 g/ml ± 40µg/ml y 800 microgramos/ml ± 80µg/ml; (e) el tampón de histidina a una concentración de 10 mm ± 5 mm; (f) polisorbato 80 a una concentración de 0,1 % ± el 0,05 % en peso a volumen (p/v); y (g) de sacarosa a una concentración de 9 % ± el 4,5 % p/v; y (h) el diluyente acuoso. En otra realización, el polisorbato 80 está a una concentración de 0,01 % ± el 0,005 % p/v y la sacarosa está a una concentración de 4,5 % ± el 1,5 % p/v.

La divulgación proporciona además un procedimiento de fabricación de una composición inmunogénica que comprende las etapas de: (a) combinar en una solución acuosa: (i) un polipéptido ClfA, (ii) un conjugado PC5-CRM_{197}, (iii) un conjugado PC8-CRM_{197}, (iv) un polipéptido MntC, (v) un tampón que tiene un pKa de 6,0 ± 0,6 y (vi) un agente de carga; y (b) liofilizar la combinación de la etapa (a) para formar una torta que comprende menos del 3 por ciento de agua en peso. En ciertas realizaciones, el procedimiento comprende además combinar (vi) un tensioactivo, en la etapa (a). En ciertas realizaciones, el procedimiento comprende además una etapa de esterilización por filtrado de la combinación de la etapa (a) antes de la liofilización de la etapa (b). En ciertas realizaciones, la solución acuosa comprende histidina 10 mM ± 5 mM, pH 6,0 ± 0,5, sacarosa al 9 % ± el 1 % p/v y polisorbato 80 al 0,1 % ± el 0,02 % p/v. En otras realizaciones, el polisorbato 80 está a una concentración del 0,01 % ± el 0,001 % p/v y la sacarosa está a una concentración del 4,5 % ± el 0,45 % p/v. En ciertas realizaciones, la etapa

de liofilización (b) comprende las etapas de: (i) congelar la combinación esterilizada de la etapa (a) a una velocidad de 0,3 ºC ± 0,03 ºC por minuto hasta alcanzar una temperatura de -50 ºC ± 5 ºC a una presión de 40 kPa (400 mbar) ± 4 kPa (40 mbar); y después mantener la combinación a -50C ± 5 ºC durante 60 minutos ± 6 minutos; (ii) recocer la combinación mediante el aumento de la temperatura a -10 ºC ± 5 ºC a una velocidad de 0,3 ºC ± 0,03 ºC por minuto; después mantener la temperatura a -10 ºC ± 5 ºC durante 120 minutos ± 12 minutos, después disminuir la temperatura a una velocidad de 0,3 ºC ± 0,03 ºC por minuto hasta alcanzar una temperatura de-50 ºC ± 5 ºC; y después mantener la temperatura a -50ºC ± 5 ºC durante 180 minutos ± 18 minutos; (iii) secar la combinación disminuyendo la presión a 50 mTorr (6,65 Pa) y manteniendo durante 30 minutos, después aumentar la temperatura a -30 ºC ± 5 ºC a una velocidad de 0,2 ºC ± 0,02 ºC por minuto; y después mantener la temperatura a -30 ºC ± 5 ºC durante 1.920 minutos ± 192 minutos; (iv) secar la combinación mediante el aumento de la temperatura a 30 ºC ± 5 ºC a una velocidad de 0,2 ºC ± 0,02 ºC por minuto; y después aumentar la presión a 200 mTorr (26,60 Pa) y manteniendo la temperatura a 30 ºC ± 5 ºC durante 720 minutos ± 72 minutos; (v) disminuir la temperatura a 5 ºC ± 5 ºC a una velocidad de 0,5 ºC ± 0,05 ºC por minuto. En algunas realizaciones, la liofilización se realiza en un vial. En algunas realizaciones, el vial se tapa después de la liofilización. En ciertas realizaciones, el vial se rellena con gas nitrógeno antes del tapado del vial. En ciertas realizaciones, el procedimiento comprende además la etapa de: (c) reconstituir la combinación liofilizada de la etapa (b) en un medio acuoso. En ciertas realizaciones, la osmolalidad de la combinación reconstituido de la etapa (c) es de entre 250 mOsM ± 25 mOsM y 300 mOsM ± 30 mOsM. En ciertas realizaciones, una composición inmunogénica de la divulgación se fabrica de acuerdo con cualquier procedimiento de fabricación de una composición inmunogénica de la divulgación.

La divulgación proporciona además una composición inmunogénica liofilizada que comprende: (a) un polipéptido factor aglutinante A ("ClfA") de Staphylococcus aureus aislado que comprende un dominio de fibrinógeno, (b) un tampón que tiene un pKa de 6,0 ± 0,6 y (c) un agente de carga. En ciertas realizaciones, el polipéptido ClfA permanece sustancialmente sin degradar durante al menos 1 mes a 37 ºC. En una realización, la invención proporciona una composición inmunogénica liofilizada que comprende agua a menos del 3 por ciento en peso del peso total de la composición inmunogénica (% p/p), en la que el polipéptido ClfA está al 0,52 por ciento ± el 0,46 % p/p y el tampón está al 0,28 % ± el 0,065 % p/p. En ciertas realizaciones, el agente de carga es sacarosa al 97 % ± el 2,0 % p/p.

La divulgación proporciona además una composición inmunogénica liofilizada que comprende: (a) un polipéptido ClfA al 0,52 % ± el 0,46 % p/p, (b) un tampón succinato al 0,28 % ± el 0,065 % p/p, (c) sacarosa al 97 % ± el 2,0 % p/p, (d) polisorbato al 0,20 % ± el 0,042 % p/p y (e) agua al 2,5 % ± el 0,5 % p/p. En ciertas realizaciones, el polipéptido ClfA permanece sustancialmente sin degradar durante al menos 1 mes a 37 ºC.

La divulgación proporciona además una composición de ClfA inmunogénica líquida fabricada reconstituyendo una composición inmunogénica liofilizada de la invención en un diluyente acuoso, teniendo dicha composición reconstituida un pH final de 6,0 ± 0,3.

La divulgación proporciona además una composición de ClfA inmunogénica líquida fabricada reconstituyendo una composición inmunogénica liofilizada de la invención en un diluyente acuoso, teniendo dicha composición reconstituida un pH final de 6,5 ± 0,3.

La divulgación proporciona además una composición inmunogénica líquida que comprende: (a) el polipéptido ClfA a una concentración de entre 20 µg/ml ± 2 µg/ml y 600 µg/ml ± 60 µg/ml; (b) el tampón histidina a 10 mM ± 5 mM; (c) polisorbato 80 al 0,1 % ± el 0,05 % en peso a volumen (p/v); y (d) sacarosa a una concentración del 9 % ± el 4,5 % p/v. En otra realización, el polisorbato 80 está a una concentración del 0,01 % ± el 0,005 % p/v y la sacarosa está a una concentración del 4,5 % ± el 1,5 % p/v.

La divulgación proporciona además un procedimiento de fabricación de una composición inmunogénica que comprende las etapas de: (a) combinar en una solución acuosa, (i) un polipéptido factor aglutinante A recombinante (rClfA), (ii) un tampón que tiene un pKa de 6,0 ± 0,6 y (iii) un agente de carga y (b) liofilizar la combinación de la etapa (a) para formar una torta que comprende menos del 3 % de agua en peso. En ciertas realizaciones, el proceso comprende además combinar (vi) un tensioactivo en la etapa (a). En ciertas realizaciones, el proceso comprende una etapa de esterilizar por filtración la combinación de la etapa (a) antes de la liofilización de la etapa (b). En ciertas realizaciones, la solución acuosa comprende histidina 10 mM ± 1 mM, pH 6,0 ± 0,5, sacarosa al 9 % ± el 1 % p/v y 80 al 0,1 % ± el 0,02 % p/v. En otras realizaciones, el polisorbato 80 está a una concentración del 0,01 % ± el 0,001 % p/v y la sacarosa está a una concentración del 4,5 % ± el 0,45 % p/v. En ciertas realizaciones, la etapa (b) de liofilización comprende las etapas de: (i) congelar la combinación esterilizada de la etapa (a) a una velocidad de 0,3 ºC ± 0,03 ºC por minuto hasta alcanzar una temperatura de -50 ºC ± 5 ºC a una presión de 40 kiloPascales (400 milibares) 4 kiloPascales (40 milibares); y después mantener la combinación a -50 ºC ± 5 ºC durante 60 minutos ± 6 minutos; (ii) recocer la combinación mediante el aumento de la temperatura a -10 ºC ± 5 ºC a una velocidad de 0,3 ºC ± 0,03 ºC por minuto; posteriormente mantener la temperatura a -10 ºC ± 5 ºC durante 120 minutos ± 12 minutos, seguido de la disminución de la temperatura a una velocidad de 0,3 ºC ± 0,03 ºC por minuto hasta alcanzar una temperatura de -50 ºC ± 5 ºC; y después manteniendo la temperatura a -50 ºC ± 5 ºC durante 180 minutos ± 18 minutos; (iii) secar la combinación disminuyendo la presión a 6,65 Pa (50 mTorr) y aumentando la temperatura a -25 ºC ± 5 ºC a una velocidad de 0,2 ºC ± 0,02 ºC por minuto; y posteriormente manteniendo la temperatura a 25 ºC ± 5 ºC durante 1.320 minutos ± 132 minutos; (iv) secar adicionalmente la combinación mediante

el aumento de la temperatura a 30 ºC ± 5 ºC a una velocidad de 0,2 ºC ± 0,02 ºC por minuto; y después aumentar la presión a 26,60 Pa (200 mTorr) y manteniendo la temperatura a 30 ºC ± 5 ºC durante 720 minutos ± 72 minutos; (v) disminuir la temperatura a 5 ºC ± 5 ºC a una velocidad de 0,5 ºC ± 0,05 ºC por minuto. En algunas realizaciones, la liofilización tiene lugar en un vial. En algunas realizaciones, el vial se tapa después de la liofilización. En ciertas realizaciones, el vial se rellena con gas nitrógeno antes del tapado del vial. En ciertas realizaciones, el procedimiento comprende además la etapa de: (c) reconstituir la combinación liofilizada de la etapa (b) en un medio acuoso. En ciertas realizaciones, la osmolalidad de la combinación reconstituido de la etapa (c) que reconstituye la combinación seca de la etapa (b) en un medio acuoso, en la que la osmolalidad de la combinación reconstituida es 300 mOsM ± 30 mOsM. En ciertas realizaciones, el medio acuoso comprende al menos dos componentes seleccionados del grupo que consiste en: (a) un polipéptido factor aglutinante B (ClfB) de *Staphylococcus aureus*, (b) un conjugado Polisacárido Capsular Tipo 5 (PC5)-proteína, (c) un conjugado Polisacárido Capsular Tipo 8 (PC8)-proteína y (d) un polipéptido MntC de *Staphylococcus aureus.* En ciertas realizaciones, la solución acuosa comprende un conjugado PC5-proteína y un conjugado PC8-proteína. En ciertas realizaciones, la solución acuosa comprende un conjugado PC5-proteína, un conjugado PC8-proteína y un polipéptido MntC. En ciertas realizaciones, una composición inmunogénica de la divulgación se fabrica de acuerdo con cualquier procedimiento de fabricación de una composición inmunogénica de la divulgación.

El polipéptido ClfA comprende un dominio N1, N2 y N3. En ciertas realizaciones, el polipéptido ClfA comprende un dominio de unión a fibrinógeno. En ciertas realizaciones, el dominio de unión a fibrinógeno se ha alterado con el fin de unirse al fibrinógeno en un nivel reducido en comparación con la unión observada al fibrinógeno con el dominio de unión a fibrinógeno nativo de ClfA. En ciertas realizaciones, el dominio de unión a fibrinógeno muestra una unión reducida al fibrinógeno por tener una sustitución de aminoácido en uno o más de Tyr 338, Tyr 256, Pro 336, Lys 389, Ala 254 e Ile 387. En ciertas realizaciones, la sustitución de aminoácido en uno o más de Tyr 338, Tyr 256, Pro 336, Lys 389, Ala 254 y Ile 387 es Ala o Ser. En ciertas realizaciones, la Tyr 338 se sustituye por Ala.

El conjugado PC5-proteína es PC5-CRM_{197}. El conjugado PC8-proteína es PC8-CRM_{197}.

En ciertas realizaciones de la presente divulgación, el tampón de la composición inmunogénica liofilizada comprende succinato a pH 6,0 ± 0,3. En ciertas realizaciones, el tampón comprende histidina a pH 6,5 ± 0,3. En ciertas realizaciones, el tampón comprende histidina a pH 6,0 ± 0,3. En ciertas realizaciones, el agente de carga se selecciona entre el grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, manitol, glicina y sorbitol. En ciertas realizaciones, el agente de carga es la sacarosa. En ciertas realizaciones, el agente de carga es sacarosa al 96 % ± el 0,2 % p/p. En ciertas realizaciones, la composición inmunogénica liofilizada comprende además un tensioactivo. En ciertas realizaciones, el tensioactivo se selecciona entre el grupo que consiste en un poloxámero, un polioxietilen alquil éter y un éster de ácido graso de polioxietilen sorbitano. En ciertas realizaciones, el éster de ácido graso de polioxietilen sorbitano es polisorbato 80. En ciertas realizaciones, el polisorbato 80 está al 0,20 % ± el 0,041 % p/p para formulaciones de tri-antígeno. En ciertas realizaciones, el polisorbato 80 está al 0,1 % ± el 0,05 % p/p para formulaciones de tetra-antígeno. En otras realizaciones, el polisorbato 80 está a una concentración del 0,01 % ± el 0,005 % p/v.

En ciertas realizaciones de la presente divulgación, la composición inmunogénica liofilizada comprende adicionalmente un adyuvante. En ciertas realizaciones, el adyuvante es ISCOMATRIX™.

En ciertas realizaciones, el diluyente acuoso de la composición líquida es agua. En ciertas realizaciones, el diluyente acuoso es una solución baja en sal. En ciertas realizaciones, la solución baja en sal comprende cloruro de sodio 60 mM ± 10 mM. En ciertas realizaciones, el diluyente acuoso comprende polisorbato 80. En ciertas realizaciones, el diluyente acuoso comprende un adyuvante. En ciertas realizaciones, el adyuvante es ISCOMATRIX™.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa un diagrama esquemático de las diversas formas de polipéptido ClfA recombinante y desvela las SEQ ID NO: 125 y 127-129.

La Figura 2 representa el cambio en la concentración de diversos lotes de proteína ClfA liofilizado en comparación con sus homólogos líquidos, expresado como ln[C], a lo largo del tiempo en diversas condiciones. Panel A: lotes n.º L36051-37-1 y L36051-44. Panel B: lote n.º L36051-72. Panel C: lote n.º L36051-81-1. Panel D: lote n.º 36051-81-2.

La Figura 3 representa cromatogramas de exclusión de tamaño de la SF L40184-61 liofilizada a t = 0 en comparación con las tortas almacenadas a 2-8 ºC, 25 ºC y 37 ºC durante tres meses.

La Figura 4 representa cromatogramas de exclusión de tamaño que comparan la formulación liofilizada con el ClfA líquido pre-liofilizado lote L36051-81-1.

La Figura 5 representa los histogramas del pH (panel A), el porcentaje de humedad (panel B) y la densidad óptica (panel C), que es una medida de la agregación, del ClfA liofilizado en diversos tiempos y condiciones de temperatura.

La Figura 6 representa histogramas del porcentaje de dímero (panel A), el porcentaje de monómero (panel B) y el porcentaje de degradación (escisión) (panel C) de ClfA, como se determinó por ET-HPLC después de 24 horas de agitación a temperatura ambiente. El eje X representa formulaciones que contenían diferentes concentraciones de polisorbato 80 (0,000, 0,0100, 0,005 y 0,100 % p/p) y sacarosa (3, 4,5 y 6 % p/p). La

formulación que no contenía PS80 presentó un aumento en la formación de dímeros porcentuales después de la agitación (panel D).

La Figura 7 representa los histogramas del porcentaje de degradación (escisión) (panel A), el porcentaje de dímero (panel B) y el porcentaje de monómero (panel C) de ClfA como se determinó por ET-HPLC para diversas formulaciones de agente de carga en el tiempo.

La Figura 8 representa la pureza de ClfA (panel A), la fuerza (antigenicidad) de PC5 (panel B) y la fuerza (antigenicidad) de PC8 a diversos tiempos después de la reconstitución de tortas de dosis altas.

La Figura 9 representa la pureza de ClfA (panel A), la fuerza (antigenicidad) de PC5 (panel B) y la fuerza (antigenicidad) de PC8 a diversos tiempos después de la reconstitución de tortas de dosis bajas.

La Figura 10 representa la concentración (panel A) y el porcentaje de pureza (panel B) de ClfA y la concentración de PC5 y PC8 (panel C) a las 0, 4 y 24 horas a temperatura ambiente después de la reconstitución.

La Figura 11 representa la concentración (panel A) y el porcentaje de pureza (panel B) de ClfA y la concentración de PC5 y PC8 (panel C) después de 1, 2 y 3 ciclos de congelación-descongelación.

La Figura 12 representa las exploraciones de dicroísmo circular (DC) de múltiples lotes de rClfA a pH 6,0 (panel A) y 7,0 (panel B).

La Figura 13 representa puntos de fusión por DC de diversos lotes de rClfA en función del pH.

La Figura 14 representa puntos de fusión por fluorescencia intrínseca del triptófano (panel A) y fluorescencia de ANS (panel B) en función del pH para rClfA*m* y r*m*ClfA.

La Figura 15 representa puntos de fusión por calorimetría diferencial de barrido (CDB) en función del pH para rClfA*m* y r*m*ClfA.

La Figura 16 representa puntos de fusión por DO_{350} de r*m*ClfA en función del pH.

La Figura 17 representa la exclusión por tamaño-HPLC en función del pH para r*m*ClfA durante seis semanas a 25 ºC (panel A) y el pH y la estabilidad por DO_{350} para formulaciones líquidas de r*m*ClfA (panel B).

La Figura 18 representa puntos de fusión por fluorescencia intrínseca del triptófano para MntC (panel A) y el seguimiento de T_m1 (panel B).

La Figura 19 representa el seguimiento de T_m1 de puntos de fusión por CDB en función del pH para MntC (panel A) y termogramas de dos acontecimientos térmicos principales (paneles B y C).

La Figura 20 representa puntos de fusión por DO_{350} de MntC en función del pH.

La Figura 21 representa cromatogramas de r*m*ClfA (panel A) y MntC (panel B) para el control de la estabilidad.

La Figura 22 representa los resultados de estabilidad de r*m*ClfA con FI-HPLC a 5 ºC (panel A) y 25 ºC (panel B) y de MntC con II-HPLC a 5 ºC (panel C) y 25 ºC (panel D).

La Figura 23 representa los resultados de estabilidad de PC5-CRM_{197} a 5 ºC y 25 ºC (paneles A y C, respectivamente) y PC8-CRM_{197} a 5 ºC y 25 ºC (paneles B y D, respectivamente) a diferentes pH mediante nefelometría.

La Figura 24 representa mediciones de osmolaridad (panel A) y DO_{350} (panel B) de muestras después de la agitación con diferentes agentes de carga.

La Figura 25 representa el ensayo de estabilidad en función del agente de carga utilizando datos de FI-HPLC para formulaciones liofilizadas de dosis alta (panel A) y dosis baja (panel B) y datos de II-HPLC para la calidad de MntC (panel C).

La Figura 26 representa los datos posteriores a la agitación de los cuatro antígenos: concentraciones de antígeno (r*m*ClfA y MntC en el panel A; PC5-CRM_{197} y PC8-CRM_{197} en el panel B), pureza de r*m*ClfA y MntC por FI-HPLC (panel B), pureza de MntC por II-HPLC (panel C), pH (panel D) y DO_{350} (panel E).

La Figura 27 representa los datos antes de la liofilización y posteriores a la liofilización de los cuatro antígenos: datos de FI-HPLC para r*m*ClfA y MntC (panel A), resultados de nefelometría para PC5-CRM_{197} (panel B) y PC8-CRM_{197} (panel C), datos IC-HPLC para MntC utilizando sacarosa al 4,5 % (panel D) y manitol al 4 %/sacarosa al 1 % (panel E), datos de CDB (panel F) y potencia porcentual de r*m*ClfA (panel G) y conjugados (panel H).

La Figura 28 representa la osmolalidad de las formulaciones de dosis alta y baja.

La Figura 29 representa los datos de pureza por FI-HPLC para MntC (panel A) y r*m*ClfA (panel B), los datos de pureza por II-HPLC para MntC (grupo C) y la cinética de la reconstitución de MntC (panel D) y la degradación de r*m*ClfA (panel E).

La Figura 30 representa la concentración de antígeno después de la reconstitución (paneles A-D) y la estabilidad del pH (panel E).

La Figura 31 representa la recuperación de la concentración del antígeno (paneles A y B) y de su pureza (paneles C y D) posterior a procedimientos de liofilización.

La Figura 32 representa la pureza de r*m*ClfA (panel A) y MntC (panel B), la concentración de r*m*ClfA (panel C) y MntC (panel D), la concentración de PC5-CRM_{197} (panel E) y PC8-CRM_{197} (F panel) y la estabilidad del pH (panel G) posteriores a la reconstitución.

La Figura 33 representa la pureza de r*m*ClfA y MntC por FI-HPLC (panel A), la pureza de MntC por II-HPLC (panel B), las concentraciones de antígenos (paneles C y D) y la estabilidad del pH (panel E) posteriores a la congelación-descongelación.

La Figura 34 representa la pureza de r*m*ClfA y MntC por FI-HPLC (panel A), la pureza de MntC por II-HPLC (panel B), las concentraciones de antígenos (paneles C y D), el pH (panel E) y la DO_{350} (panel F) posteriores a la agitación.

La Figura 35 representa la degradación de MntC reconstituido con ISCOMATRIX™ a 2-8 ºC (panel A) y 25 ºC (panel B) analizada por IC-HPLC después de 24 horas, la pureza del r*m*ClfA reconstituido con ISCOMATRIX™ analizada por CEX-HPLC (paneles C y D), la pureza de MntC reconstituido con ISCOMATRIX™ a 2-8 ºC (panel

E) y 25 ºC (panel F) analizada por FI-HPLC, las concentraciones de conjugado PC5-CRM_{197} y PC8-CRM_{197} con ISCOMATRIX™ a 2-8 ºC (Panel G) y 25 ºC (panel H) y las concentraciones de r*m*ClfA y MntC con ISCOMATRIX™ a 2-8 ºC (panel E) y 25 ºC (panel J).

La Figura 36 representa las concentraciones de ISCOMATRIX™ durante 24 horas a 2-8 ºC (panel A) y 25 ºC (panel B), el tamaño de partícula de ISCOMATRIX™ (panel C) y la estabilidad del pH (panel D) de las formulaciones reconstituidas.

La Figura 37 representa la pureza (panel A) y la desamidación de MntC reconstituido con ISCOMATRIX™ analizadas por FI-HPLC después de 4 horas y las concentraciones de antígeno con ISCOMATRIX™ (paneles C y D).

La Figura 38 representa el tamaño de partícula de ISCOMATRIX™ (panel A) y la estabilidad del pH (panel B) de las formulaciones reconstituidas durante 4 horas.

Las Figuras 39A-J representan la alineación de ClfA entre diversas cepas de *S. aureus* (SEQ ID NO: 62, 64, 68, 84, 70, 104, 66, 78, 86, 88, 90, 72, 74, 76, 80, 94, 82, 92, 96, 98, 100, 102, 106 y 108, respectivamente, en orden de aparición).

Las Figuras 40A-I representan la alineación de ClfB entre diversas cepas de *S. aureus* (SEQ ID NO: 26, 28, 32, 18, 54, 34, 36, 30, 16, 20, 22, 24, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 56, 58 y 60, respectivamente, en orden de aparición).

La Figura 41A-C representa la alineación de MntC entre diversas cepas de *S. aureus* (SEQ ID NO: 2, 8, 10, 4, 6, 14 y 12, respectivamente, en orden de aparición).

La Figura 42 representa un gráfico de secuencias de ClfB de diferentes cepas de *S. aureus*.

La Figura 43 representa un gráfico de secuencias de MntC de diferentes cepas de *S. aureus*.

Descripción detallada de la invención

Aunque pueden utilizarse cualesquiera procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o el ensayo de la invención, se describen ahora los procedimientos y materiales preferidos.

Los términos utilizados en el presente documento tienen los significados reconocidos y conocidos por los expertos en la materia, sin embargo, por comodidad y completitud, se exponen a continuación términos particulares y sus significados.

Como se utilizan en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, las referencias a "el procedimiento" incluyen uno o más procedimientos y/o etapas del tipo descrito en el presente documento y/o que serán evidentes para los expertos en la materia tras leer la presente divulgación y así sucesivamente.

El término "aproximado" o "aproximadamente" significa dentro de un intervalo estadísticamente significativo de un valor. Un intervalo de este tipo puede estar dentro de un orden de magnitud, normalmente dentro del 20 %, más normalmente todavía dentro del 10 %, e incluso más normalmente dentro del 5 % de un valor o intervalo dado. La variación permitida abarcada por el término "aproximado" o "aproximadamente" depende del sistema particular en estudio y puede apreciarse fácilmente por un experto habitual en la materia. A condición de que se cite un intervalo en la presente solicitud, también se contempla cada uno de los números enteros dentro del intervalo como una realización de la invención.

Un "anticuerpo" es una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a una diana, tal como un carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno, localizado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se utiliza en el presente documento, a menos que se indique lo contrario por el contexto, el término se pretende abarcar no solo anticuerpos monoclonales o policlonales intactos, sino también anticuerpos modificados por ingeniería genética (por ejemplo, quiméricos, humanizados y/o derivatizados para alterar las funciones efectoras, la estabilidad y otras actividades biológicas) y fragmentos de los mismos (tales como Fab, Fab', F(ab')2, Fv), de anticuerpos cadena sencilla (ScFv) y de dominio, incluyendo anticuerpos de tiburón y de camélidos) y proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos a condición de que muestren la actividad biológica deseada) y fragmentos de anticuerpos como se describe en el presente documento y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno. Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, tal como IgG, IgA o IgM (o subclase de los mismos) y el anticuerpo no necesita ser de ninguna clase en particular. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM y varias de éstas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2 en los seres humanos. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidos.

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden solo una porción de un anticuerpo intacto, en los que la porción retiene

preferentemente al menos una, preferentemente la mayoría o todas, las funciones normalmente asociadas a la porción cuando está presente en un anticuerpo intacto.

El término "antígeno" se refiere en general a una molécula biológica, por lo general una proteína, péptido, polisacárido, lípido o conjugado que contiene al menos un epítopo al que un anticuerpo homólogo puede unirse selectivamente; o en algunos casos a una sustancia inmunogénica que puede estimular la producción de anticuerpos o respuestas de linfocitos T o ambos, en un animal, incluyendo composiciones que se inyectan o se absorben en un animal. La respuesta inmunitaria puede generarse para la molécula entera o para una o más diferentes porciones de la molécula (por ejemplo, un epítopo o hapteno). El término puede utilizarse para referirse a una molécula individual o a una población homogénea o heterogénea de moléculas antigénicas. Un antígeno es reconocido por anticuerpos, receptores de linfocitos T u otros elementos de la inmunidad humoral y/o celular específica. El término "antígeno" incluye todos los epítopos antigénicos relacionados. Los epítopos de un antígeno dado pueden identificarse utilizando cualquier número de técnicas de cartografiado de epítopos, bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocolos* en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, N. J. Por ejemplo, los epítopos lineales pueden determinarse mediante, por ejemplo, la síntesis simultáneamente de un gran número de péptidos sobre soportes sólidos, correspondiendo los péptidos a porciones de la molécula de proteína y la reacción de los péptidos con anticuerpos mientras los péptidos aún están unidos a los soportes. Dichas técnicas se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 4,708,871; Geysen y col. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81:3998-4002; Geysen y col. (1986) *Molec. ImMunol*. 23:709-715. De forma similar, los epítopos conformacionales pueden identificarse determinando la conformación espacial de aminoácidos tal como mediante, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear de 2 dimensiones. Véase, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocolos*, citado anteriormente. Además, para los fines de la presente invención, un "antígeno" también puede utilizarse para referirse a una proteína que incluye modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (generalmente conservadoras en la naturaleza, pero pueden ser no conservadoras), de la secuencia nativa, a condición de que la proteína mantenga la capacidad de provocar una respuesta inmunológica. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de mutagénesis dirigida, o a través de procedimientos de síntesis particulares, o a través de un enfoque de ingeniería genética, o pueden ser accidentales, tales como a través de mutaciones de los hospedadores, que producen los antígenos. Además, el antígeno puede derivar, obtenerse o aislarse de un microbio, por ejemplo, una bacteria, o puede ser un organismo completo. De forma similar, un oligonucleótido o polinucleótido que expresa un antígeno, tal como en aplicaciones de inmunización con ácidos nucleicos, también se incluye en la definición. También se incluyen antígenos sintéticos, por ejemplo, poliepítopos, epítopos flanqueantes y otros antígenos recombinantes o derivados por síntesis (Bergmann y col. (1993) *Eur J. Immunol* 23:2777 2781; Bergmann y col. (1996) *J. Immunol*. 157:3242 3249; Suhrbier, A. (1997) *Immunol and Cell Biol*. 75:402 408; Gardner y col. (1998) 12ª Conferencia Mundial sobre el SIDA, Ginebra, Suiza, 28 junio a 3 julio de 1998).

El término "adyuvante" se refiere a un compuesto o mezcla que potencia la respuesta inmunitaria a un antígeno como se describe y ejemplifica adicionalmente en el presente documento.

"Bacteriemia" es una presencia transitoria de bacterias en la sangre. Una bacteriemia puede progresar a septicemia o sepsis, que se consideraría una infección y es la presencia persistente de bacterias en la sangre con signos/síntomas clínicos asociados. No todas las bacterias son capaces de sobrevivir en la sangre. Las que tienen rasgos genéticos especiales que proporcionan esa capacidad. Además, los factores del hospedador también desempeñan un papel importante.

"Polisacárido capsular" o "polisacárido de la cápsula" se refieren a la cápsula de polisacárido que es externa a la pared celular de la mayoría de los aislados de estafilococos. Por ejemplo, *S. aureus* incluye un componente de la pared celular compuesto de un complejo de peptidoglicano, que permite al organismo sobrevivir en condiciones osmóticas desfavorables y también incluye un único ácido teicoico unido al peptidoglicano. Externa a la pared celular, una fina cápsula de polisacárido recubre la mayor parte de los aislados *de S. aureus.* Esta cápsula serológicamente distinta puede utilizarse para serotipar diversos aislados *de S. aureus.* Se ha demostrado que muchos de los aislados clínicamente significativos incluyen dos tipos capsulares: serotipo 5 (PC5) y serotipo 8 (PC8).

Como se utiliza en el presente documento, los "conjugados" comprenden un polisacárido de la cápsula por lo general de un intervalo de pesos moleculares deseado y una proteína transportadora, en los que el polisacárido de la cápsula se conjuga a la proteína transportadora. Los conjugados pueden o pueden no contener una cierta cantidad de polisacárido de la cápsula libre. Como se utiliza en el presente documento, "polisacárido de la cápsula libre" se refiere al polisacárido de la cápsula que está asociado no covalentemente a (es decir, unido de forma no covalente a, adsorbido en o atrapado en o con) el conjugado polisacárido capsular-proteína transportadora. Las expresiones "polisacárido de la cápsula libre", "polisacárido libre" y "sacárido libre" pueden utilizarse indistintamente y se pretende que transmitan el mismo significado. Independientemente de la naturaleza de la molécula transportadora, puede conjugarse con el polisacárido capsular, ya sea directamente o a través de un engarce. Como se utilizan en el presente documento, "conjugar", "conjugado" y "conjugación" se refieren a un procedimiento mediante el cual un polisacárido capsular bacteriano se une covalentemente a la molécula transportadora. La conjugación potencia la inmunogenicidad del polisacárido capsular bacteriano. La conjugación puede realizarse de acuerdo con los procedimientos que se describen a continuación o mediante procedimientos conocidos en la

técnica.

Como se ha descrito anteriormente, la presente divulgación se refiere a conjugados que comprenden polisacáridos capsulares del serotipo 5 (PC5) de *S. aureus* conjugados con proteínas transportadoras y conjugados que comprenden polisacáridos capsulares del serotipo 8 (PC8) de *S. aureus* conjugados a proteínas transportadoras. Una realización de la divulgación proporciona conjugados que comprenden un polisacárido capsular del serotipo 5 de *S. aureus* conjugado con una proteína vehículo y un polisacárido capsular del serotipo 8 de *S. aureus* conjugado con una proteína vehículo en los que: el polisacárido capsular de tipo 5 tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 800 kDa; el polisacárido capsular de tipo 8 tiene un peso molecular de entre 50 y 700 kDa; los conjugados inmunogénicos tienen pesos moleculares de entre aproximadamente 1000 kDa y aproximadamente 5000 kDa; y los conjugados comprenden menos de aproximadamente el 30 % de polisacárido libre con relación al polisacárido total. En una realización, los conjugados comprenden menos de aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 10 % o aproximadamente el 5 % de polisacárido libre con relación al polisacárido total. En una realización, el polisacárido de tipo 5 o 8 tiene un peso molecular de entre aproximadamente 20 kDa y aproximadamente 1000 kDa; entre aproximadamente 50 kDa y aproximadamente 500 kDa; entre aproximadamente 50 kDa y aproximadamente 200 kDa; y entre aproximadamente 75 kDa y aproximadamente 150 kDa.

En una realización, el conjugado tiene un peso molecular de entre aproximadamente 50 kDa y aproximadamente 5000 kDa. En una realización, el conjugado tiene un peso molecular de entre aproximadamente 200 kDa y aproximadamente 5000 kDa. En una realización, el conjugado inmunogénico tiene un peso molecular de entre aproximadamente 400 kDa y aproximadamente 2500 kDa. En una realización, el conjugado inmunogénico tiene un peso molecular de entre aproximadamente 500 kDa y aproximadamente 2500 kDa. En una realización, el conjugado inmunogénico tiene un peso molecular de entre aproximadamente 600 kDa y aproximadamente 2800 kDa. En una realización, el conjugado inmunogénico tiene un peso molecular de entre aproximadamente 700 kDa y aproximadamente 2700 kDa. En una realización, el conjugado inmunogénico tiene un peso molecular de entre aproximadamente 1000 kDa y aproximadamente 2000 kDa; entre aproximadamente 1800 kDa y aproximadamente 2500 kDa; entre aproximadamente 1100 kDa y aproximadamente 2200 kDa; entre aproximadamente 1900 kDa y aproximadamente 2700 kDa; entre aproximadamente 1200 kDa y aproximadamente 2400 kDa; entre aproximadamente 1700 kDa y aproximadamente 2600 kDa; entre aproximadamente 1300 kDa y aproximadamente 2600 kDa; entre aproximadamente 1600 kDa y aproximadamente 3000 kDa.

La proteína transportadora en el conjugado inmunogénico es CRM_{197} y el CRM_{197} está covalentemente unido al polisacárido capsular a través de un enlace carbamato, un enlace amida o ambos. El número de restos de lisina en la proteína transportadora que se conjugan con un polisacárido capsular puede caracterizarse como un intervalo de lisinas conjugadas. Por ejemplo, en una composición inmunogénica dada, la CRM_{917} puede comprender de 5 a 15 lisinas de 39 covalentemente unidas al polisacárido capsular. Otra forma de expresar este parámetro es que del 12 % al 40 % de las lisinas de CRM_{917} están covalentemente unidas al polisacárido capsular. En algunas realizaciones, la porción CRM_{917} del polisacárido unido covalentemente unido a la CRM_{917} comprende de 5 a 25 lisinas unidas covalentemente al polisacárido. En algunas realizaciones, la porción CRM_{917} del polisacárido unido covalentemente a la CRM_{197} comprende de 5 a 20 lisinas unidas covalentemente al polisacárido. En algunas realizaciones, la porción CRM_{917} del polisacárido unido covalentemente a la proteína transportadora comprende de 10 a 25 lisinas covalentemente unidas al polisacárido. En algunas realizaciones, la porción CRM_{917} del polisacárido unido covalentemente a la proteína transportadora comprende de 8 a 15 lisinas covalentemente unidas al polisacárido. Por ejemplo, en una composición inmunogénica dada, la CRM_{197} puede comprender de 18 a 22 lisinas de 39 covalentemente unidas al polisacárido capsular. Otra forma de expresar este parámetro es que del 40 % al 60 % de las lisinas de CRM_{197} están covalentemente unidas al polisacárido capsular. En algunas realizaciones, la CRM_{197} comprende de 5 a 15 lisinas de 39 unidas covalentemente al PC8. Otra forma de expresar este parámetro es que del 12 % al 40 % de las lisinas de CRM_{917} están unidas covalentemente al PC8. En algunas realizaciones, la CRM_{917} comprende de 18 a 22 lisinas de 39 unidas covalentemente al PC5. Otra forma de expresar este parámetro es que del 40 % al 60 % de las lisinas de CRM_{197} están unidas covalentemente al PC5.

Como se ha analizado anteriormente, el número de restos de lisina en la proteína transportadora conjugada con el polisacárido capsular puede caracterizarse como un intervalo de lisinas conjugadas, que puede expresarse como una relación molar. Por ejemplo, la relación molar de lisinas conjugadas con CRM_{197} en el conjugado inmunogénico PC8 puede ser de entre aproximadamente 18:1 a aproximadamente 22:1. En una realización, el intervalo de relaciones molares de lisinas conjugadas con CRM_{197} en el conjugado inmunogénico PC8 puede ser de entre aproximadamente 15:1 a aproximadamente 25:1. En algunas realizaciones, el intervalo de relaciones molares de lisinas conjugados con CRM_{917} en el conjugado inmunogénico PC8 puede ser de entre aproximadamente 14:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 12:1 a aproximadamente 18:1; de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 16:1; de aproximadamente 8:1 a aproximadamente 14:1; de aproximadamente 6:1 a aproximadamente 12:1; de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 10:1; de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 26:1; de aproximadamente 22:1 a aproximadamente 28:1; de aproximadamente 24:1 a aproximadamente 30:1; de aproximadamente 26:1 a aproximadamente 32:1; de aproximadamente 28:1 a aproximadamente 34:1; de aproximadamente 30:1 a aproximadamente 36:1; de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 10:1; de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 20:1; o de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 30:1. Además, la relación molar de lisinas

conjugadas con CRM_{197} en el conjugado inmunogénico PC5 puede ser de entre aproximadamente 3:1 y 25:1. En una realización, el intervalo de relaciones molares de lisinas conjugadas con CRM_{197} en el conjugado inmunogénico PC5 puede ser de entre aproximadamente 5:1 a aproximadamente 20:1. En una realización, el intervalo de relaciones molares de lisinas conjugadas con CRM_{197} en el conjugado inmunogénico PC5 puede ser de entre aproximadamente 4:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 6:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 7:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 8:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 11:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 12:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 13:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 14:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 15:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 16:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 17:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 18:1 a aproximadamente 20:1; de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 18:1; de aproximadamente 7:1 a aproximadamente 16:1; o de aproximadamente 9:1 a aproximadamente 14:1.

Otra forma de expresar el número de restos de lisina en la proteína transportadora conjugada con el polisacárido capsular puede ser como un intervalo de lisinas conjugadas. Por ejemplo, en un conjugado inmunogénico PC8 dado, la CRM_{197} puede comprender de 5 a 15 lisinas de 39 unidas covalentemente al polisacárido capsular. Como alternativa, este parámetro puede expresarse como un porcentaje. Por ejemplo, en un conjugado inmunogénico PC8 dado, el porcentaje de lisinas conjugadas puede ser de entre el 10 % y el 50 %. En algunas realizaciones, del 20 % al 50 % de las lisinas pueden estar unidas covalentemente a PC8. Como otra alternativa, del 30 % al 50 % de las lisinas de CRM_{197} pueden estar unidas covalentemente a PC8; del 10 % al 40 % de las lisinas de CRM_{197}; del 10 % al 30 % de las lisinas de CRM_{197}; del 20 % al 40 % de las lisinas de CRM_{197}; del 25 % al 40 % de las lisinas de CRM_{197}; del 30 % al 40 % de las lisinas de CRM_{197}; del 10 % al 30 % de las lisinas de CRM_{197}; del 15 % al 30 % de las lisinas de CRM_{197}; del 20 % al 30 % de las lisinas de CRM_{197}; del 25 % al 30 % de las lisinas de CRM_{197}; del 10 % al 15 % de las lisinas de CRM_{197}; o del 10 % al 12 % de las lisinas de CRM_{197} están unidas covalentemente a PC8. Además, en un conjugado inmunogénico PC5 dado, la CRM_{197} puede comprender de 18 a 22 lisinas de 39 unidas covalentemente al polisacárido capsular. Como alternativa, este parámetro puede expresarse como un porcentaje. Por ejemplo, en un conjugado inmunogénico PC5 dado, el porcentaje de lisinas conjugadas puede ser de entre el 40 % y el 60 %. En algunas realizaciones, del 40 % al 60 % de las lisinas pueden estar unidas covalentemente a PC5. Como otra alternativa, del 30 % al 50 % de las lisinas de CRM_{197} pueden estar unidas covalentemente a PC5; del 20 % al 40 % de las lisinas de CRM_{197}; del 10 % al 30 % de las lisinas de CRM_{197}; del 50 % al 70 % de las lisinas de CRM_{197}; del 35 % al 65 % de las lisinas de CRM_{197}; del 30 % al 60 % de las lisinas de CRM_{197}; del 25 % al 55 % de las lisinas de CRM_{197}; del 20 % al 50 % de las lisinas de CRM_{197}; del 15 % al 45 % de las lisinas de CRM_{197}; del 10 % al 40 % de las lisinas de CRM_{197}; del 40 % al 70 % de las lisinas de CRM_{197}; o del 45 % al 75 % de las lisinas de CRM_{197} están unidas covalentemente a PC5.

La frecuencia de unión de la cadena de polisacárido capsular a una lisina en la molécula transportadora es otro parámetro para la caracterización de los conjugados de polisacáridos de la cápsula. Por ejemplo, en una realización, se produce al menos un enlace covalente entre CRM_{197} y el polisacárido por al menos cada 5 a 10 unidades de repetición de sacáridos del polisacárido capsular. En otra realización, hay al menos un enlace covalente entre CRM_{197} y el polisacárido capsular por cada 5 a 10 unidades de repetición de sacáridos; cada 2 a 7 unidades de repetición de sacáridos, cada 3 a 8 unidades de repetición de sacáridos; cada 4 a 9 unidades de repetición de sacáridos; cada 6 a 11 unidades de repetición de sacáridos; cada 7 a 12 unidades de repetición de sacáridos; cada 8 a 13 unidades de repetición de sacáridos; cada 9 a 14 unidades de repetición de sacáridos; cada 10 a 15 unidades de repetición de sacáridos; cada 2 a 6 unidades de repetición de sacáridos, cada 3 a 7 unidades de repetición de sacáridos; cada 4 a 8 unidades de repetición de sacáridos; cada 6 a 10 unidades de repetición de sacáridos; cada 7 a 11 unidades de repetición de sacáridos; cada 8 a 12 unidades de repetición de sacáridos; cada 9 a 13 unidades de repetición de sacáridos; cada 10 a 14 unidades de repetición de sacáridos; cada 10 a 20 unidades de repetición de sacáridos; cada 5 a 10 unidades de repetición de sacáridos del polisacárido capsular. En otra realización, se produce al menos un enlace entre CRM_{197} y el polisacárido capsular por cada 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 unidades de repetición de sacáridos del polisacárido capsular.

La activación química de los polisacáridos y la posterior conjugación con la proteína transportadora pueden conseguirse por medios convencionales. Véase, por ejemplo, la patente de los EE.UU. N.º 4.673.574 y 4.902.506. Pueden utilizarse otros procedimientos de activación y conjugación como alternativa.

"Proteína transportadora" o "transportador proteínico", como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier molécula de proteína que puede conjugarse con un antígeno (tal como los polisacáridos capsulares) contra el que se desea una respuesta inmunitaria. La conjugación de un antígeno tal como un polisacárido con una proteína transportadora puede convertir el antígeno en inmunogénico. Las proteínas transportadoras son preferentemente proteínas que son no tóxicas y no reactógenas y obtenibles en cantidad y pureza suficientes. Son ejemplos de proteínas transportadoras las toxinas, los toxoides o cualquier material de reacción cruzada mutante (CRM_{197}) de la toxina del tétanos, difteria, tos ferina, especies de *Pseudomonas, E. coli*, especies de *Staphylococcus* y especies de *Streptococcus.* Las proteínas transportadoras deben ser susceptibles de procedimientos de conjugación convencionales. En una realización particular de la presente invención, se utiliza CRM_{197} como la proteína transportadora.

CRM_{197} (Wyeth/Pfizer, Sanford, NC) es una variante no tóxica (es decir, toxoide) de la toxina diftérica aislada de

cultivos de *Corynebacterium diphtheriae* cepa C7 (β_{197}) cultivados en casaminoácidos y medio a base de extracto de levadura. CRM_{197} se purifica a través de ultrafiltración, precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico. Un cultivo de *Corynebacterias diphtheriae* cepa C7 (β_{197}), que produce la proteína $CRM_{197,}$ se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, Maryland y se le asignó el número de referencia ATCC 53281. Otros toxoides de difteria también son adecuados para su uso como proteínas transportadoras.

Otras proteínas transportadoras adecuadas incluyen toxinas bacterianas inactivadas tales como el toxoide tetánico, toxoide pertúsico, toxoide colérico (por ejemplo, como se describe en la solicitud de patente internacional W02004/083251), *E. coli* LT, *E. coli* TS y la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa.* También pueden utilizarse proteínas de membrana externa bacteriana tales como el complejo de proteínas de membrana externa c (CPME), porinas, proteínas de unión a transferrina, neumolisina, proteína de superficie neumocócica (PspA), proteína adhesina neumocócica (PAAS), la enterotoxina (toxina A) y la citotoxina (toxina B) de C. *difficile* o la proteína D de *Haemophilus influenzae*. También pueden utilizarse otras proteínas, tales como la peptidasa estreptocócica C5a (SCP), ovoalbúmina, hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero bovino (BSA) o un derivado proteínico purificado de tuberculina (PPD) como proteínas transportadoras.

Después de la conjugación del polisacárido capsular con la proteína transportadora, los conjugados polisacárido-proteína se purifican (se enriquecen con respecto a la cantidad de conjugado polisacárido-proteína) mediante una diversidad de técnicas. Estas técnicas incluyen, por ejemplo, las operaciones de concentración/diafiltración, precipitación/elución, cromatografía en columna y filtración en profundidad. Véanse los ejemplos a continuación.

Después de que se purifican los conjugados individuales, pueden combinarse para formular una composición inmunogénica de la presente invención, que puede utilizarse, por ejemplo, en una vacuna. Formulación de la composición inmunogénica de la presente invención puede conseguirse utilizando procedimientos reconocidos en la técnica.

Se observa que en la presente divulgación, las expresiones tales como "comprende", "compuesto de", "que comprende", "contiene", "que contiene" y similares pueden tener el significado que se les atribuye en la ley de patentes de los EE.UU.; por ejemplo, que pueden significar "incluye", "incluido", "que incluye" y similares. Dichas expresiones se refieren a la inclusión de un ingrediente particular o de un conjunto de ingredientes, sin excluir ningún otro ingrediente. Expresiones tales como "que consiste esencialmente en" y "consiste esencialmente en" tienen el significado que se les atribuye en la ley de patentes de los EE.UU., por ejemplo, permiten la inclusión de ingredientes o etapas adicionales que no restan valor a las características nuevas o básicas de la invención, es decir, excluyen ingredientes o etapas adicionales no mencionados que restan valor a las características nuevas o básicas de la invención y excluyen ingredientes o etapas de la técnica anterior, tales como documentos de la técnica que se citan en el presente documento, especialmente ya que es un objetivo del presente documento definir realizaciones que son patentables por ejemplo, nuevas, no evidentes, inventivas, por encima la técnica anterior, por ejemplo, por encima de los documentos citados en el presente documento. Y, las expresiones "consiste en" y "que consiste en" tienen el significado que se les atribuye en la ley de patentes de los EE.UU; es decir, que estos términos son cerrados. En consecuencia, estos términos se refieren a la inclusión de un ingrediente particular o conjunto de ingredientes y a la exclusión de todos los demás ingredientes.

Una "sustitución de aminoácidos conservadora" se refiere a la sustitución de uno o más de los restos de aminoácidos de una proteína por otros restos de aminoácidos que tienen propiedades físicas y/o químicas similares. Los sustitutos para un aminoácido dentro de la secuencia pueden seleccionarse entre otros miembros de la clase a la que pertenece el aminoácido. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos que contienen estructuras de anillo aromático son fenilalanina, triptófano y tirosina. Los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos (básicos) cargados positivamente incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos ácidos (ácido) cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. No se Retención que dichas alteraciones afecten al peso molecular aparente determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida o punto isoeléctrico. Son sustituciones particularmente preferidas: Lys por Arg y viceversa de manera que puede mantenerse una carga positiva; Asp por Glu y viceversa de manera que puede mantenerse una carga negativa; Ser por Thr de manera que puede mantenerse un -OH libre; y Gin por Asn de manera que puede mantenerse un NH_2 libre.

"Fragmento" se refiere a proteínas en las que se incluyeron solo dominios específicos de una proteína más grande. Por ejemplo, las proteínas ClfA y ClfB contienen tantos como 8 dominios cada una si se incluyen las secuencias señal. Un polipéptido que corresponde a los dominios N1N2N3, N2N3, N1N2, N1, N2 o N3 se considera cada uno como fragmentos de ClfA o ClfB. "Fragmento" también se refiere a ya sea una proteína o un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 4 restos de aminoácidos (preferentemente, al menos 10 restos de aminoácidos, al menos 15 restos de aminoácidos, al menos 20 restos de aminoácidos, al menos 25 restos de aminoácidos, al menos 40 restos de aminoácidos, al menos 50 restos de aminoácidos, al menos 60 restos de aminoácidos, al menos 70 restos de aminoácidos, al menos 80 restos de aminoácidos, al menos 90 restos de aminoácidos, al menos 100 restos de aminoácidos, al menos 125 restos de aminoácidos o al menos 150 restos de aminoácidos) de la secuencia de aminoácidos de una proteína o polipéptido parental o un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos de al menos 10 pares de bases (preferentemente al menos 20 pares de

bases, al menos 30 pares de bases, al menos 40 pares de bases, al menos 50 pares de bases, al menos 50 pares de bases, al menos 100 pares de bases, al menos 200 pares de bases) de la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico parental.

"Actividad funcional" de un anticuerpo o "anticuerpo funcional" como se utiliza en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que, como mínimo, puede unirse específicamente a un antígeno. Se conocen en la técnica funciones adicionales y pueden incluir componentes adicionales del sistema inmunitario que afectan al aclaramiento o destrucción del patógeno tal como a través de opsonización, CCDA o citotoxicidad mediada por el complemento. Después de la unión del antígeno, cualesquiera funciones de anticuerpos posteriores pueden estar mediadas a través de la región Fc del anticuerpo. El ensayo opsonofagocítico del anticuerpo (EPA) es ensayo *in vitro* diseñado para *medir* la destrucción de las bacterias asistida por el complemento Ig *in vitro* con células efectoras (células blancas de la sangre), imitando así un procedimiento biológico. La unión del anticuerpo también puede inhibir directamente la función biológica del antígeno al que se une, por ejemplo, los anticuerpos que se unen a ClfA pueden neutralizar su función enzimática. En algunas realizaciones, un "anticuerpo funcional" se refiere a un anticuerpo que es funcional como se mide por la destrucción de las bacterias en un modelo animal de eficacia o un ensayo de destrucción opsonofagocítica que demuestra que los anticuerpos destruyen las bacterias.

El peso molecular de los polisacáridos de la cápsula de *S. aureus* es una consideración para su uso en composiciones inmunogénicas. Por ejemplo, los polisacáridos de la cápsula de alto peso molecular pueden ser capaces de inducir ciertas respuestas inmunitarias de anticuerpos debido a una valencia más alta de los epítopos presentes en la superficie antigénica. El aislamiento de "polisacáridos capsulares de alto peso molecular" se contempla para su uso en las composiciones y procedimientos de la presente invención. Por ejemplo, en una realización de la invención, se contempla el aislamiento de polisacáridos de alto peso molecular de tipo 5 que varían en tamaño de aproximadamente 50 a aproximadamente 800 kDa en peso molecular. En una realización de la invención, se contempla el aislamiento de polisacáridos de alto peso molecular de tipo 5 que varían en tamaño de aproximadamente 20 a aproximadamente 1000 kDa en peso molecular. En una realización de la invención, se contempla el aislamiento y purificación de polisacáridos capsulares de alto peso molecular de tipo 5 que varían en tamaño de aproximadamente 50 a aproximadamente 300 kDa de peso molecular. En una realización, se contempla el aislamiento y purificación de un polisacárido capsular de alto peso molecular de tipo 5 que varía de 70 kDa a 300 kDa en peso molecular. En una realización, se contempla el aislamiento y purificación de un polisacárido capsular de alto peso molecular de tipo 5 que varía de 90 kDa a 250 kDa en peso molecular. En una realización, se contempla el aislamiento y purificación de un polisacárido capsular de alto peso molecular de tipo 5 que varía de 90 kDa a 150 kDa en peso molecular. En una realización, se contempla el aislamiento y purificación de un polisacárido capsular de alto peso molecular de tipo 5 que varía de 90 kDa a 140 kDa en peso molecular. En una realización, se contempla el aislamiento y purificación de un polisacárido capsular de alto peso molecular de tipo 5 que varía de 80 kDa a 120 kDa de peso molecular. Otros intervalos de polisacárido capsular de alto peso molecular del serotipo 5 que puede aislarse y purificarse por los procedimientos de la presente invención incluyen intervalos de tamaño de aproximadamente 70 kDa a aproximadamente 100 kDa en peso molecular; de 70 kDa a 110 kDa en peso molecular; de 70 kDa a 120 kDa en peso molecular; de 70 kDa a 130 kDa en peso molecular; de 70 kDa a 140 kDa en peso molecular; de 70 kDa a 150 kDa en peso molecular; de 70 kDa a 160 kDa en peso molecular; de 80 kDa a 110 kDa en peso molecular; de 80 kDa a 120 kDa en peso molecular; de 80 kDa a 130 kDa en peso molecular; de 80 kDa a 140 kDa en peso molecular; de 80 kDa a 150 kDa en peso molecular; de 80 kDa a 160 kDa en peso molecular; de 90 kDa a 110 kDa en peso molecular; de 90 kDa a 120 kDa en peso molecular; de 90 kDa a 130 kDa en peso molecular; de 90 kDa to 140 kDa en peso molecular; de 90 kDa a 150 kDa en peso molecular; de 90 kDa a 160 kDa en peso molecular; de 100 kDa a 120 kDa en peso molecular; de 100 kDa a 130 kDa en peso molecular; de 100 kDa a 140 kDa en peso molecular; de 100 kDa a 150 kDa en peso molecular; de 100 kDa a 160 kDa en peso molecular; e intervalos de pesos moleculares similares deseados.

Como se ha analizado anteriormente, el peso molecular de los polisacáridos de la cápsula de *S. aureus* es una consideración para su uso en composiciones inmunogénicas. Por ejemplo, los polisacáridos de la cápsula de alto peso molecular pueden ser capaces de inducir ciertas respuestas inmunitarias de anticuerpos debido a una valencia más alta de los epítopos presentes en la superficie antigénica. En una realización de la invención, se contempla el aislamiento y purificación de polisacáridos de alto peso molecular de tipo 8 que varían de aproximadamente 20 kDa a aproximadamente 1000 kDa en peso molecular. En una realización de la invención, se contempla el aislamiento y purificación de polisacáridos de alto peso molecular de tipo 8 que varían de aproximadamente 50 kDa a aproximadamente 700 kDa en peso molecular. En una realización de la invención, se contempla el aislamiento y purificación de polisacáridos de alto peso molecular de tipo 8 que varían de 50 kDa a 300 kDa en peso molecular. En una realización, se contempla el aislamiento y purificación de polisacáridos de alto peso molecular de tipo 8 que varían de 70 kDa a 300 kDa en peso molecular. En una realización, se contempla el aislamiento y purificación de polisacáridos de alto peso molecular de tipo 8 que varían de 90 kDa a 250 kDa de peso molecular. En una realización, se contempla el aislamiento y purificación de polisacáridos de alto peso molecular de tipo 8 que varían de 90 kDa a 150 kDa en peso molecular. En una realización, se contempla el aislamiento y purificación de polisacáridos de alto peso molecular de tipo 8 que varían de 90 kDa a 120 kDa de peso molecular. En una realización, se contempla el aislamiento y purificación de polisacáridos de alto peso molecular de tipo 8 que varían de 80 kDa a 120 kDa en peso molecular. Otros intervalos de polisacárido capsular de alto peso molecular del serotipo 8 que puede aislarse y purificarse por los procedimientos de la presente invención incluyen intervalos de

tamaño de aproximadamente 70 kDa a aproximadamente 100 kDa en peso molecular; de 70 kDa a 110 kDa en peso molecular; de 70 kDa a 120 kDa en peso molecular; de 70 kDa a 130 kDa en peso molecular; de 70 kDa a 140 kDa en peso molecular; de 70 kDa a 150 kDa en peso molecular; de 70 kDa a 160 kDa en peso molecular; de 80 kDa a 110 kDa en peso molecular; de 80 kDa a 120 kDa en peso molecular; de 80 kDa a 130 kDa en peso molecular; de 80 kDa a 140 kDa en peso molecular; de 80 kDa a 150 kDa en peso molecular; de 80 kDa a 160 kDa en peso molecular; de 90 kDa a 110 kDa en peso molecular; de 90 kDa a 120 kDa en peso molecular; de 90 kDa a 130 kDa en peso molecular; de 90 kDa to 140 kDa en peso molecular; de 90 kDa a 150 kDa en peso molecular; de 90 kDa a 160 kDa en peso molecular; de 100 kDa a 120 kDa en peso molecular; de 100 kDa a 130 kDa en peso molecular; de 100 kDa a 140 kDa en peso molecular; de 100 kDa a 150 kDa en peso molecular; de 100 kDa a 160 kDa en peso molecular; e intervalos de pesos moleculares similares deseados.

Una "respuesta inmunitaria" a una composición inmunogénica es el desarrollo en un sujeto de una respuesta humoral y/o una respuesta inmunitaria mediada por células a las moléculas presentes en la composición de interés (por ejemplo, un antígeno, tal como una proteína o polisacárido). Para los fines de la presente invención, una "respuesta inmunitaria humoral" es una respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos e implica la generación de anticuerpos con afinidad por los antígenos presentes en las composiciones inmunogénicas de la invención, mientras que una "respuesta inmunitaria mediada por células" es una mediada por linfocitos T y/u otros glóbulos blancos de la sangre. Una "respuesta inmunitaria mediada por células" se provoca por la presentación de epítopos antigénicos en asociación con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I o clase II. Esto activa linfocitos T auxiliares CD4+ específicos de antígeno o linfocitos T citotóxicos CD8+ ("LTC"). Los LTC tienen especificidad para antígenos peptídicos o lipídicos que se presentan en asociación con proteínas codificadas por el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) o CD1 y expresadas en las superficies de las células. Los LTC ayudan a inducir y promover la destrucción intracelular de microbios intracelulares o la lisis de células infectadas con dichos microbios. Otro aspecto de la inmunidad celular implica una respuesta específica de antígeno por linfocitos T auxiliares. Los linfocitos T auxiliares actúan para ayudar a estimular la función, y enfocar la actividad, de células efectoras no específicas contra células que presentan antígenos peptídicos en asociación con moléculas del CMH clásico o no clásico en su superficie. Una "respuesta inmunitaria mediada por células" también se refiere a la producción de citocinas, quimiocinas y otras moléculas producidas por linfocitos T activados y/u otros glóbulos blancos de la sangre, incluyendo los derivados de linfocitos T CD4+ y CD8+. La capacidad de un antígeno o composición particular para estimular una respuesta inmunológica mediada por células puede determinarse por un número de ensayos, tales como por linfoproliferación (activación de linfocitos), ensayos de linfocitos citotóxicos LTC, por ensayo para determinar linfocitos T específicos para el antígeno en un sujeto sensibilizado o por la medición de la producción de citocinas por linfocitos T en respuesta a la reestimulación con el antígeno. Dichos ensayos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Erickson y col., *J. Immunol*. (1993) 151:4189-4199; Doe y col., *Eur. J. Immunol.* (1994) 24:2369-2376.

El término "inmunogénico" se refiere a la capacidad de un antígeno o una vacuna para provocar una respuesta inmunitaria, ya sea humoral o mediada por células o ambas.

Una "cantidad inmunogénica" o una "cantidad inmunológicamente eficaz" o "dosis", cada uno de los cuales se utiliza indistintamente en el presente documento, se refieren generalmente a la cantidad de antígeno o composición inmunogénica suficiente para provocar una respuesta inmunitaria, ya sea una respuesta celular (linfocito T) o humoral (células B o anticuerpo) o ambas, como se mide mediante ensayos convencionales conocidos por un experto en la materia.

La cantidad de un conjugado particular en una composición generalmente se calcula basándose en el polisacárido total, conjugado y no conjugado para ese conjugado. Por ejemplo, un conjugado de PC5 con un 20 % de polisacárido libre tendrá aproximadamente 80 mcg de polisacárido PC5 conjugado y aproximadamente 20 mcg de polisacárido PC5 no conjugado en una dosis de polisacárido PC5 de 100 mcg. La contribución proteínica al conjugado por lo general no se tiene en cuenta en el cálculo de la dosis de un conjugado. La cantidad de conjugado puede variar dependiendo del serotipo estafilocócico. Generalmente, cada dosis comprenderá de 0,01 a 100 mcg de polisacárido, en particular de 0,1 a 10 mcg y más en particular 1 a 10 mcg. La "cantidad inmunogénica" de los diferentes componentes polisacarídicos en la composición inmunogénica, puede divergir y cada uno puede comprender 0,01 mcg, 0,1 mcg, 0,25 mcg, 0,5 mcg, 1 mcg, 2 mcg, 3 mcg, 4 mcg, 5 mcg, 6 mcg, 7 mcg, 8 mcg, 9 mcg, 10 mcg, 15 mcg, 20 mcg, 30 mcg, 40 mcg, 50 mcg, 60 mcg, 70 mcg, 80 mcg, 90 mcg o 100 mcg de cualquier antígeno polisacarídico particular.

En otra realización, la "cantidad inmunogénica" de los componentes proteínicos en la composición inmunogénica, puede variar de aproximadamente 10 mcg a aproximadamente 300 mcg de cada antígeno proteínico. En una realización particular, la "cantidad inmunogénica" de los componentes proteínicos en la composición inmunogénica, puede variar de aproximadamente 20 mcg a aproximadamente 200 mcg de cada antígeno proteínico. La "cantidad inmunogénica" de los diferentes componentes proteínicos en la composición inmunogénica puede divergir y comprender cada uno 10 mcg, 20 mcg, 30 mcg, 40 mcg, 50 mcg, 60 mcg, 70 mcg, 80 mcg, 90 mcg, 100 mcg, 125 mcg, 150 mcg, 175 mcg o aproximadamente 200 mcg de cualquier antígeno proteínico en particular.

La eficacia de un antígeno como inmunógeno puede medirse mediante la medición de los niveles de actividad de las células B mediante la medición de los niveles de anticuerpos circulantes específicos para el antígeno en el suero

utilizando inmunoensayos, ensayos de inmunoprecipitación, ensayos de anticuerpos funcionales, tales como el ensayo de opsonización *in vitro* y muchos otros ensayos conocidos en la técnica. Otra medida de la eficacia de un antígeno como inmunógeno de linfocitos T puede medirse por cualquiera de los ensayos de proliferación, por ensayos citolíticos, tales como ensayos de liberación de cromo para medir la capacidad de un linfocito T para lisar su célula diana específica. Además, en la presente invención, una "cantidad inmunogénica" también ser definirse mediante la medición de los niveles séricos de anticuerpos específicos de antígeno inducidos después de la administración del antígeno, o, mediante la medición de la capacidad de los anticuerpos inducidos de este modo para mejorar la capacidad opsonofagocítica de glóbulos blancos de la sangre particulares, como se describe en el presente documento. El nivel de protección de la respuesta inmunitaria puede medirse mediante la prueba del hospedador inmunizado con el antígeno que se ha inyectado. Por ejemplo, si el antígeno para el que se desea una respuesta inmunitaria es una bacteria, el nivel de protección inducida por la "cantidad inmunogénica" del antígeno puede medirse mediante la detección del porcentaje de supervivencia o el porcentaje de mortalidad después de la exposición de los animales con las células bacterianas. En una realización, la cantidad de protección puede medirse mediante la medición de al menos un síntoma asociado a la infección bacteriana, por ejemplo, una fiebre asociada a la infección. La cantidad de cada uno de los antígenos en la vacuna o las composiciones inmunogénicas de múltiples antígenos o de múltiples componentes puede variar con respecto a cada uno de los demás componentes y puede determinarse por procedimientos conocidos por el experto. Dichos procedimientos incluyen, por ejemplo, procedimientos para la medición de la inmunogenicidad y/o la eficacia *in vivo*.

La expresión "composición inmunogénica" se refiere a cualquier composición farmacéutica que contenga un antígeno, por ejemplo, un microorganismo o un componente del mismo, composición que puede utilizarse para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto. Las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden utilizarse para tratar a un ser humano susceptible a la infección por *S. aureus,* por medio de la administración de las composiciones inmunogénicas a través de una vía sistémica transdérmica o en la mucosa. Estas administraciones pueden incluir la inyección a través de las vías intramuscular (i.m.), Intraperitoneal (i.p.), intradérmica (i.d.) o subcutánea; la aplicación mediante un parche u otro dispositivo de entrega transdérmica; o por medio de la administración por vía mucosa a los tractos oral/alimentario, respiratorio o genitourinario. En una realización, se utiliza la administración intranasal para el tratamiento o la prevención del estado de portador nasofaríngeo *de S. aureus,* atenuando así la infección en su etapa más temprana. En una realización, la composición inmunogénica puede utilizarse en la fabricación de una vacuna o en la inducción de anticuerpos policlonales o monoclonales que podrían utilizarse para proteger o tratar de forma pasiva a un animal.

Las cantidades óptimas de componentes para una composición inmunogénica particular pueden determinarse mediante estudios convencionales que implican la observación de respuestas inmunes apropiadas en sujetos. Después de una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo adecuadamente espaciadas.

En una realización de la presente descripción, la composición inmunogénica liofilizada de *S. aureus* comprende un fragmento (N1N2N3 o combinaciones del mismo) de factor aglutinante A (ClfA) de *S. aureus* recombinante. En una realización adicional de la presente descripción, la composición inmunogénica liofilizada de *S. aureus* comprende un fragmento de factor aglutinante A (ClfA) de *S. aureus* recombinante, un aislado de polisacáridos capsulares de tipo 5 conjugados con CRM_{197} y un aislado de polisacáridos capsulares de tipo 8 conjugados con CRM197.

Las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden comprender adicionalmente uno o más "inmunomoduladores" adicionales, que son agentes que perturban o alteran el sistema inmunitario, de manera que se observa o bien la regulación positiva o la regulación negativa de la inmunidad humoral y/o mediada por células. En una realización particular, se prefiere la regulación positiva de las ramas humoral y/o mediada por células del sistema inmunitario. Los ejemplos de ciertos inmunomoduladores incluyen, por ejemplo, un adyuvante o citocina, o ISCOMATRIX™ (CSL Limited, Parkville, Australia), descrito en la Patente de los EE.UU. N.º 5.254.339 entre otras. Los ejemplos no limitantes de adyuvantes que pueden utilizarse en la vacuna de la presente invención incluyen el sistema adyuvante RIBI (Ribi Inc., Hamilton, Mont.), alumbre, geles minerales tales como gel de hidróxido de aluminio, emulsiones aceite en-agua, emulsiones agua-en-aceite tales como, por ejemplo, los adyuvantes completo e incompleto de Freund, copolímero Block (CytRx, Atlanta Ga.), QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge Mass.), SAF-M (Chiron, Emeryville California.), adyuvante AMPHIGEN®, saponina, Quil A u otra fracción de saponina, monofosforil lípido A y adyuvante lípido-amina Avridine. Los ejemplos no limitantes de emulsiones aceite-en-agua útiles en la vacuna de la invención incluyen formulaciones de SEAM62 y SEAM 1/2 modificados. El SEAM62 modificado es una emulsión aceite-en-agua que contiene escualeno (Sigma) al un 5 % (v/v), Span® 85 detergente (ICI Surfactants) al 1 % (v/v), polisorbato 80 detergente (ICI Surfactants) al 0,7 % (v/v), etanol al 2,5 % (v/v), Quil A 200 µg/ml, colesterol 100 µg/ml y lecitina al 0,5 % (p/v). El SEAM 1/2 modificado es una emulsión aceite-en-agua que comprende escualeno al 5 % (v/v), Span® 85 detergente al 1 % (v/v), polisorbato 80 detergente al 0,7 % (v/v), etanol al 2,5 % (v/v), Quil A 100 µg/ml y colesterol 50 µg/ml. Otros "inmunomoduladores" que pueden incluirse en las composiciones de la invención incluyen, por ejemplo, una o más interleucinas, interferones u otras citocinas o quimiocinas conocidas. En una realización, el adyuvante puede ser un derivado de ciclodextrina o un polímero polianiónico, tal como los descritos en las patentes de los EE.UU. números 6.165.995 y 6.610.310, respectivamente. Ha de entenderse que el inmunomodulador y/o adyuvante que han de utilizarse dependerá del sujeto al que se administra la vacuna o la composición inmunogénica, la vía de inyección y el número de inyecciones que han de proporcionarse.

En una realización adicional más de la presente divulgación, la composición inmunogénica liofilizada de *S. aureus* comprende un fragmento de factor aglutinante A (ClfA) de *S. aureus* recombinante, un aislado de polisacáridos capsulares de tipo 5 conjugados con CRM_{197}, un aislado de polisacáridos capsulares de tipo 8 conjugado con CRM_{197} y una proteína recombinante MntC (también conocida como rP305A). En algunas realizaciones, la proteína MntC está lipidada. En otras realizaciones, la proteína MntC no está lipidada. En otra realización, la composición inmunogénica de *S. aureus* es una formulación estéril (líquida, liofilizada, vacuna de ADN, preparación intradérmica) de fragmento de factor aglutinante A (ClfA) de *S. aureus* recombinante (N1N2N3 o combinaciones del mismo), fragmento de factor aglutinante B (ClfB) de *S. aureus* recombinante (N1N2N3 o combinaciones del mismo), un aislado de polisacáridos capsulares de tipo 5 conjugado con CRM_{197} y un aislado de polisacáridos capsulares de tipo 8 conjugado con CRM_{197}.

En una realización de la presente invención, la composición inmunogénica liofilizada de *S. aureus* comprende un fragmento de factor aglutinante A (ClfA) de *S. aureus* recombinante (N1N2N3), proteína de unión a hierro MntC de *S. aureus*, un aislado de polisacáridos capsulares de tipo 5 conjugado con CRM_{197} y un aislado de polisacáridos capsulares de tipo 8 conjugado con CRM_{197}. En una realización, la composición inmunogénica de *S. aureus* es una formulación estéril (líquida) de fragmento de factor aglutinante A (ClfA) de *S. aureus* recombinante (N1N2N3), fragmento de factor aglutinante B (ClfB) de *S. aureus* recombinante (N1N2N3 o combinaciones del mismo), proteína de unión a hierro MntC de *S. aureus*, un aislado de polisacáridos capsulares de tipo 5 conjugado con CRM_{197} y un aislado de polisacáridos capsulares de tipo 8 conjugado con CRM_{197}.

En una realización de la presente invención, la composición inmunogénica liofilizada de *S. aureus* comprende un fragmento de factor aglutinante B (ClfB) de *S. aureus* recombinante (N1N2N3 o combinaciones del mismo), un aislado de polisacáridos capsulares de tipo 5 conjugado con CRM_{197} y un aislado de polisacáridos capsulares de tipo 8 conjugado con CRM_{197}. En una realización de la presente invención, la composición inmunogénica de *S. aureus* comprende un fragmento de factor aglutinante B (ClfB) de *S. aureus* recombinante (N1N2N3 o combinaciones del mismo), proteína de unión a hierro MntC de *S. aureus*, un aislado de polisacáridos capsulares de tipo 5 conjugado con CRM_{197} y un aislado de polisacáridos capsulares de tipo 8 conjugado con CRM_{197}. En una realización de la presente invención, la composición inmunogénica de *S. aureus* comprende una proteína de unión a hierro MntC de *S. aureus*, un aislado de polisacáridos capsulares de tipo 5 conjugado con CRM_{197} y un aislado de polisacáridos capsulares de tipo 8 conjugado con CRM_{197}.

Una "enfermedad invasiva" por *S. aureus* es el aislamiento de bacterias de un sitio normalmente estéril, cuando existen signos/síntomas clínicos de la enfermedad asociados. Normalmente sitios corporales estériles incluyen la sangre, LCR, fluido pleural, líquido pericárdico, líquido peritoneal, líquido articular/sinovial, hueso, sitio interno del cuerpo (ganglios linfáticos, cerebro, corazón, hígado, bazo, fluido vítreo, riñón, páncreas, ovario) u otros sitios normalmente estériles. Las afecciones clínicas que caracterizan las enfermedades invasivas incluyen bacteriemia, neumonía, celulitis, osteomielitis, endocarditis, choque séptico y más.

El término "aislado" significa que el material se retira de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural si es de origen natural o de su organismo hospedador si se trata de una entidad recombinante, o se toma de un entorno a un entorno diferente). Por ejemplo, un polisacárido de la cápsula, proteína o péptido "aislado" está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la fuente celular o tisular de la que deriva la proteína, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente o de otro modo presentes en una mezcla, como parte de una reacción química. En la presente invención, las proteínas o polisacáridos pueden aislarse de la célula bacteriana o de residuos celulares, de manera que se proporcionan en una forma útil en la fabricación de una composición inmunogénica. El término "aislado" o "aislamiento" puede incluir purificar, o la purificación, incluyendo, por ejemplo, los procedimientos de purificación de las proteínas o polisacáridos capsulares, como se describe en el presente documento. La frase "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de un polipéptido/proteína en las que el polipéptido/proteína está separado de componentes celulares de las células de las que se aísla o se produce recombinantemente. Por tanto, un polisacárido de la cápsula, proteína o péptido que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones del polisacárido de la cápsula, proteína o péptido que tiene menos de aproximadamente el 30 %, el 20 %, el 10 %, el 5 %, el 2,5 % o el 1 %, (en peso seco) de proteína o polisacárido contaminante u otro material celular. Cuando el polipéptido/proteína se produce de forma recombinante, también está preferentemente sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente el 20 %, el 10 % o el 5 % del volumen de la preparación proteínica. Cuando el polipéptido/proteína o polisacárido se producen por síntesis química, están preferentemente sustancialmente libres de precursores químicos u otros productos químicos, es decir, están separados de precursores químicos u otros productos químicos que están implicados en la síntesis de la proteína o polisacárido. En consecuencia, dichas preparaciones del polipéptido/proteína o polisacárido tienen menos de aproximadamente el 30 %, el 20 %, el 10 %, el 5 % (en peso seco) de precursores químicos o compuestos distintos del fragmento de polipéptido/proteína o polisacárido de interés.

Una "sustitución de aminoácidos no conservadora" se refiere a la sustitución de uno o más de los restos de aminoácidos de una proteína con otros restos de aminoácidos que tienen propiedades físicas y/o químicas diferentes, utilizando las características definidas anteriormente.

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa un vehículo aprobado por una agencia reguladora de un gobierno federal, estatal u otro organismo regulador, o enumerado en la Farmacopea de los EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, incluidos los seres humanos, así como mamíferos no humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o medio de soporte con el que se administra la composición farmacéutica. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de petróleo, animales, vegetales o sintéticos. Pueden emplearse agua, soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos líquidos, en particular para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes, de carga, emulsionantes o agentes tamponantes del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, formulaciones de liberación sostenida y similares. Se describen ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados en "*Remington's Pharmaceutical Sciences*" de E. W. Martin. La formulación debe adecuarse al modo de administración.

Los términos "proteína", "polipéptido" y "péptido" se refieren a un polímero de restos de aminoácidos y no están limitados a una longitud mínima del producto. Por tanto, péptidos, oligopéptidos, dímeros, multímeros y similares, se incluyen dentro de la definición. Tanto las proteínas de longitud completa como los fragmentos de las mismas se incluyen en la definición. Los términos también incluyen modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (generalmente conservadoras en la naturaleza, pero que pueden ser no conservadoras), a una secuencia nativa, preferentemente de manera que la proteína mantenga la capacidad de inducir una respuesta inmunológica en un animal al que se le administra la proteína. También se incluyen modificaciones posteriores a la expresión, por ejemplo, glicosilación, acetilación, lipidación, fosforilación y similares.

Una respuesta inmunitaria "protectora" se refiere a la capacidad de una composición inmunogénica de inducir una respuesta inmunitaria, ya sea humoral o mediada por células, que sirve para proteger al sujeto de una infección. No es necesario que la protección proporcionada sea absoluta, es decir, no es necesario que la infección se prevenga o se erradique totalmente, si existe una mejora estadísticamente significativa en comparación con una población control de sujetos, por ejemplo, los animales infectados a los que no se les administra la vacuna o composición inmunogénica. La protección puede limitarse a mitigar la gravedad o la rapidez de la aparición de los síntomas de la infección. En general, una "respuesta inmunitaria protectora" incluiría la inducción de un aumento en los niveles de anticuerpos específicos para un antígeno particular en al menos el 50 % de los sujetos, incluyendo cierto nivel de respuestas medibles de anticuerpos funcionales a cada antígeno. En situaciones particulares, una "respuesta inmunitaria protectora" podría incluir la inducción de un aumento de dos veces en los niveles de anticuerpos o un aumento de cuatro veces en los niveles de anticuerpos específico para un antígeno en particular en al menos el 50 % de los sujetos, incluyendo cierto nivel de respuestas medibles de anticuerpos funcionales a cada antígeno. En ciertas realizaciones, los anticuerpos opsonizantes se correlacionan con una respuesta inmunitaria protectora. Por tanto, la respuesta inmunitaria protectora puede someterse a ensayo mediante la medición del porcentaje de disminución en el recuento de bacterias en un ensayo de opsonofagocitosis, por ejemplo los que se describen a continuación. Preferentemente, existe una disminución en el recuento bacteriano de al menos el 10 %, el 25 %, el 50 %, el 65 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 % o más.

El término "recombinante" como se utiliza en el presente documento simplemente se refiere a cualquier proteína, polipéptido o célula que expresa un gen de interés que se produce por procedimientos de ingeniería genética. El término "recombinante" como se utiliza con respecto a una proteína o polipéptido, significa un polipéptido producido mediante la expresión de un polinucleótido recombinante. Las proteínas utilizadas en las composiciones inmunogénicas de la invención pueden aislarse de una fuente natural o pueden producirse por procedimientos de ingeniería genética, tales como, por ejemplo ClfA recombinante, ClfB recombinante o MntC recombinante. "Recombinante", como se utiliza en el presente documento, describe adicionalmente una molécula de ácido nucleico, que, en virtud de su origen o manipulación, no está asociada a todo o una parte del polinucleótido con el que se asocia en la naturaleza. El término "recombinante" como se utiliza con respecto a una célula hospedadora significa una célula hospedadora en la que se ha introducido un polinucleótido recombinante.

ClfA recombinante (rClfA) y ClfB recombinante (rClfB) como se utilizan en el presente documento se refieren a formas de ClfA o ClfB para su uso en las composiciones inmunogénicas de la divulgación. En ciertas realizaciones, rClfA es un fragmento de ClfA que comprende uno o más de los dominios N, por ejemplo, N1N2N3, N2N3, N2 o N3 y se denomina en el presente documento "ClfA recombinante" o "rClfA". En una realización, rClfB es un fragmento de ClfB que comprende uno o más de los dominios N de ClfB, por ejemplo, N1N2N3, N2N3, N2 o N3 y se denomina en el presente documento "ClfB recombinante" o "rClfB".

El término "sujeto" se refiere a un mamífero, ave, pez, reptil o cualquier otro animal. El término "sujeto" incluye también los seres humanos. El término "sujeto" incluye también los animales domésticos. Los ejemplos no limitantes de los animales domésticos incluyen: perros, gatos, cerdos, conejos, ratas, ratones, jerbos, hámsteres, cobayas, hurones, pájaros, serpientes, lagartos, peces, tortugas y ranas. El término "sujeto" incluye también los animales de granja. Los ejemplos no limitantes de los animales de granja incluyen: alpacas, bisontes, camellos, vacas, ciervos, cerdos, caballos, llamas, mulas, burros, ovejas, cabras, conejos, renos, yaks, pollos, gansos y pavos.

Como se utiliza en el presente documento, "tratamiento" (incluyendo las variaciones del mismo, por ejemplo, "tratar" o "tratado") se refiere a uno cualquiera o más de los siguientes: (i) la prevención de la infección o la reinfección, como en una vacuna tradicional, (ii) la reducción de la gravedad de, o, la eliminación de los síntomas y (iii) la eliminación sustancial o completa del patógeno o trastorno en cuestión. Por tanto, el tratamiento puede efectuarse de forma profiláctica (antes de la infección) o de forma terapéutica (después de la infección). En la presente invención, pueden utilizarse tratamientos profilácticos o terapéuticos. De acuerdo con una realización particular de la presente divulgación, se proporcionan composiciones y procedimientos que tratan, incluyendo la inmunización de forma profiláctica y/o terapéutica, un animal hospedador contra una infección microbiana (por ejemplo, una bacteria tal como especies de *Staphylococcus*). Los procedimientos de la presente divulgación son útiles para conferir inmunidad profiláctica y/o terapéutica a un sujeto. Los procedimientos de la presente divulgación también pueden ponerse en práctica en sujetos para aplicaciones de investigación biomédica.

Los términos "vacuna" o "composición de vacuna", que se utilizan indistintamente, se refieren a composiciones farmacéuticas que comprenden al menos una composición inmunogénica que induce una respuesta inmunitaria en un animal.

Descripción general

La presente divulgación se refiere a composiciones inmunogénicas liofilizadas que comprenden antígenos de un organismo estafilocócico, por ejemplo *S. aureus.* En algunas realizaciones, la composición inmunogénica liofilizada comprende ClfA. En algunas realizaciones, la composición inmunogénica liofilizada comprende al menos tres antígenos. En algunas realizaciones, la composición inmunogénica liofilizada comprende al menos cuatro antígenos. Los antígenos pueden aislarse a partir del organismo utilizando procedimientos bioquímicos de aislamiento o pueden producirse sintéticamente o por medios recombinantes. Los antígenos pueden ser polipéptidos o polisacáridos o una combinación de los mismos. Estas composiciones inmunogénicas pueden utilizarse en la fabricación de una vacuna para inmunizar sujetos contra infecciones provocadas por un organismo estafilocócico. Los componentes adecuados para su uso en estas composiciones se describen en mayor detalle a continuación.

Composiciones inmunogénicas estafilocócicas

S. aureus es el agente causal de una amplia diversidad de enfermedades humanas que van desde infecciones superficiales de la piel a afecciones potencialmente mortales tales como la neumonía, la sepsis y la endocarditis. Véase Lowy *N. Eng. J. Med*. 339:580-532 (1998). En los casos de enfermedad invasiva, el *S. aureus* puede aislarse de sitios del cuerpo normalmente estériles, incluyendo la sangre, el líquido cefalorraquídeo LCR, el líquido pleural, el líquido pericárdico, el líquido peritoneal, el líquido articular/sinovial, el hueso, los sitios internos del cuerpo (los ganglios linfáticos, el cerebro, el corazón, el hígado, el bazo, el fluido vítreo, el riñón, el páncreas, el ovario) o de otros sitios normalmente estériles. Esto puede conducir a afecciones clínicas potencialmente mortales tales como bacteriemia, neumonía, celulitis, osteomielitis, endocarditis y choque séptico. Los pacientes adultos, ancianos y pediátricos están en mayor riesgo de infecciones por *S. aureus*.

Realizaciones de la presente divulgación describen un antígeno o antígenos seleccionados en las composiciones inmunogénicas liofilizadas incluyendo un polipéptido factor aglutinante A (ClfA) de *S. aureus* aislado, un polisacárido capsular de tipo 5 de *S. aureus* aislado conjugado con una proteína transportadora, un polisacárido capsular de tipo 8 de *S. aureus* aislado conjugado con una proteína transportadora, un factor aglutinante B (ClfB) de *S. aureus* aislado y una MntC de *S. aureus* aislada. Algunas formulaciones de las composiciones inmunogénicas liofilizadas se sometieron a ensayo para demostrar el aumento de la estabilidad de la proteína ClfA. Algunas formulaciones de las composiciones inmunogénicas liofilizadas se sometieron a ensayo para demostrar la estabilidad de la proteína MntC. Algunas formulaciones de las composiciones liofilizadas también se sometieron a ensayo para asegurar que los conjugados PC5-proteína y los conjugados PC8-proteína eran estables después de la liofilización.

En consecuencia, una composición inmunogénica liofilizada comprende: un polipéptido factor aglutinante A (ClfA) de *S. aureus* aislado. Una composición inmunogénica liofilizada comprende: un polipéptido factor aglutinante A (ClfA) de *S. aureus* aislado, un polisacárido capsular de tipo 5 de *S. aureus* aislado conjugado con una proteína transportadora y un polisacárido capsular de tipo 8 de *S. aureus* aislado conjugado con una proteína transportadora. Una composición inmunogénica liofilizada comprende: un polipéptido factor aglutinante A (ClfA) de *S. aureus* aislado, un factor aglutinante B (ClfB) de *S. aureus* aislado, un polisacárido capsular de tipo 5 de *S. aureus* aislado conjugado con una proteína transportadora y un polisacárido capsular de tipo 8 de *S. aureus* aislado conjugado con una proteína transportadora. Una composición inmunogénica liofilizada comprende: un polipéptido factor aglutinante A (ClfA) de *S. aureus* aislado, un polipéptido factor aglutinante B (ClfB) de *S. aureus* aislado, una proteína MntC de *S. aureus* aislada, un polisacárido capsular de tipo 5 de *S. aureus* aislado conjugado con una proteína transportadora y un polisacárido capsular de tipo 8 de *S. aureus* aislado conjugado con una proteína transportadora. Una composición inmunogénica liofilizada comprende: un polipéptido factor aglutinante A (ClfA) de *S. aureus* aislado, una proteína MntC de *S. aureus* aislada, un polisacárido capsular de tipo 5 de *S. aureus* aislado conjugado con una proteína transportadora y un polisacárido capsular de tipo 8 de *S. aureus* aislado conjugado con una proteína transportadora. Una composición inmunogénica liofilizada comprende: un polipéptido factor aglutinante B (ClfB) de *S. aureus* aislado, un polisacárido capsular de tipo 5 de *S. aureus* aislado conjugado con una proteína transportadora y un polisacárido capsular de tipo 8 de *S. aureus* aislado conjugado con una proteína transportadora.

Una composición inmunogénica liofilizada comprende: un polipéptido factor aglutinante B (ClfB) de *S. aureus* aislado, una proteína MntC de *S. aureus* aislada, un polisacárido capsular de tipo 5 de *S. aureus* aislado conjugado con una proteína transportadora y un polisacárido capsular de tipo 8 de *S. aureus* aislado conjugado con una proteína transportadora. Una composición inmunogénica liofilizada comprende: una proteína MntC de *S. aureus* aislada, un polisacárido capsular de tipo 5 de *S. aureus* aislado conjugado con una proteína transportadora y un polisacárido capsular de tipo 8 de *S. aureus* aislado conjugado con una proteína transportadora. Una composición inmunogénica liofilizada comprende: un polipéptido factor aglutinante A (ClfA) de *S. aureus* aislado, un polipéptido factor aglutinante B (ClfB) de *S. aureus* aislado y una proteína MntC de *S. aureus* aislada.

En algunas realizaciones, las combinaciones anteriores comprenden adicionalmente al menos uno de los siguientes antígenos: EkeS, DsqA, KesK, KrkN, KrkN2, RkaS, RrkN, KnkA, SdrC, SdrD, SdrE, Opp3a, DltD, HtsA, LtaS, IsdA, IsdB, IsdC, SdrF, SdrG, SdrH, SrtA, SpA, Sbi, alfa-hemolisina (HLA), beta-hemolisina, proteína de unión a fibronectina A (fnbA), proteína de unión a fibronectina B (febB), coagulasa, Fig, map, leucocidina Panton-Valentine (PVL), toxina alfa y sus variantes, toxina gamma (hig) y variantes, ica, transportador ABC inmunodominante, transportador de Mg^{2+}, transportador Ni ABC, RAP, autolisina, receptores de laminina, isaA/PisA, IsaB/PisB, SPOIIIE, SsaA, EbpS, SasA, SasF, SasH, EFB (FIB), SBI, Npasa, EBP, sialo proteína de unión al hueso II, precursor de aureolisina (AUR)/Sepp1 Cna y fragmentos de los mismos, tales como M55, TSST-1, mecA, exopolisacárido poli-N-acetilglucosamina (PNAG/dPNAG), GehD, EbhA, EbhB, SSP-1, SSP-2, HBP, proteína de unión a vitronectina, Hara, EsxA, EsxB, enterotoxina A, enterotoxina B, enterotoxina C1 y autolisina nueva.

Adyuvantes

Las composiciones inmunogénicas liofilizadas como se describen en el presente documento también comprenden, en ciertas realizaciones, uno o más adyuvantes. En algunas realizaciones, el adyuvante es un componente de la composición liofilizada seca. En otras realizaciones, el adyuvante puede añadirse a la composición liofilizada reconstituida antes de la administración de la composición al paciente. Un adyuvante es una sustancia que potencia la respuesta inmunitaria cuando se administra junto con un inmunógeno o antígeno. Se ha demostrado que un número de citocinas o linfocinas tienen actividad moduladora inmunitaria y, por tanto, son útiles como adyuvantes, incluyendo, pero no limitadas a, las interleucinas 1-α, 1-β, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 5.723.127), 13, 14, 15, 16, 17 y 18 (y sus formas mutantes); los interferones-α, β y γ; factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 5.078.996 y el número de referencia ATCC 39900); factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF); factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF); y factores de necrosis tumoral α y β. Otros adyuvantes más que son útiles con las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento incluyen quimiocinas, incluyendo, sin limitación, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β y RANTES; moléculas de adhesión, tales como una selectina, por ejemplo, L-selectina, P-selectina y E-selectina; moléculas similares a mucina, como, por ejemplo, CD34, GlyCAM-1 y MadCAM-1; un miembro de la familia de las integrinas tal como LFA-1, VLA-1, Mac-1 y p150.95; un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas tal como PECAM, ICAM, por ejemplo, ICAM-1, ICAM-2 y ICAM-3, CD2 y LFA-3; moléculas co-estimulantes tales como B7-1, B7-2, CD40 y CD40L; factores de crecimiento incluyendo el factor de crecimiento vascular, el factor de crecimiento nervioso, el factor de crecimiento de fibroblastos, el factor de crecimiento epidérmico, PDGF, BL-1 y el factor de crecimiento endotelial vascular; moléculas receptoras incluyendo Fas, receptor de TNF, Fit, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2 y DR6; y la caspasa (ICE).

Los adyuvantes adecuados utilizados para potenciar una respuesta inmunitaria incluyen adicionalmente, sin limitación, MPL™ (monofosforil lípido A 3-O-desacilado, Corixa, Hamilton, MT), que se describe en la Patente de los EE.UU. N.º 4.912.094. También son adecuados para su uso como adyuvantes los análogos sintéticos de lípido A o compuestos de fosfato de aminoalquil glucosamina (AGP) o derivados o análogos de los mismos, que están disponibles de Corixa (Hamilton, MT) y que se describen en la Patente de los EE.UU. N.º 6.113.918. Uno de estos AGP es 2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil-amino] etil 2-desoxi-4-O-fosfono-3-O-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil-amino]-b-D-glucopiranósido, que también se conoce como 529 (anteriormente conocido como RC529). Este adyuvante 529 está formulado como una forma acuosa (FA) o como una emulsión estable (EE).

Otros adyuvantes más incluyen péptidos de muramilo, tales como N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE); emulsiones aceite-en-agua, tales como MF59 (Patente de los EE.UU. N.º 6.299.884) (que contiene escualeno al 5 %, polisorbato 80 al 0,5 % y SPAN™ 85 al 0,5 % (que contiene opcionalmente diversas cantidades de MTP-PE) formulado en partículas submicrométricas utilizando un microfluidificador tal como el microfluidificador Model 110Y (Microfluidics, Newton, MA)); y SAF (que contiene escualeno al 10 %, polisorbato 80 al 0,4 %, polímero bloqueado con Pluronic L121 al 5 % y thr-MDP, ya sea microfluidificado en una emulsión submicrométrica o agitado con formación de vórtice para generar una emulsión de tamaño de partícula más grande); adyuvante incompleto de Freund (IFA); sales de aluminio (alumbre), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio; Amphigen; Avridine; L121/escualeno; D-lactida-polilactida/glucósido; polioles Pluronic; *Bordetella* inactivada; saponinas, tales como STIMULON™ QS-21 (Antigenics, Framingham, MA.), descritos en la Patente de los EE.UU. N.º 5.057.540, ISCOMATRIX™ (CSL Limited, Parkville, Australia), que se describe en la Patente de los EE.UU. N.º 5.254.339 y complejos inmunoestimulantes (ISCOMATRIX™); *Mycobacterium tuberculosis;* lipopolisacáridos

bacterianos; polinucleótidos sintéticos tales como oligonucleótidos que contienen un motivo CpG (por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 6.207.646); IC-31 (Intercell AG, Viena, Austria), que se describe en la patente europea N.º 1.296.713 y 1.326.634; una toxina pertúsica (PT) o mutante de la misma, una toxina colérica o mutante de la misma (por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N.º 7.285.281, 7.332.174, 7.361.355 y 7.384.640); o una toxina termolábil (LT) de *E. coli* o mutante de la misma, en particular LT-K63, LT-R72 (por ejemplo, Patentes de los EE.UU. N.º 6.149.919, 7.115.730 y 7.291.588).

En algunas realizaciones, el adyuvante es ISCOMATRIX™ (véase, por ejemplo, Davis y col., *Proc Nat'l Acad Sci*, 2004, 101(29):10697-10702).

Antígenos candidatos:

ClfA: organización del dominio

El factor aglutinante A (ClfA) es una proteína de superficie de *S. aureus* asociada a la unión a proteínas de la matriz del hospedador a través de un sitio de unión a fibrinógeno. ClfA es miembro de una familia de proteínas que contienen el motivo LPXTG de carboxilo terminal (SEQ ID NO: 125) que permite que la proteína se una covalentemente a la superficie celular. ClfA también pertenece a otra familia de proteínas (molécula de la matriz adhesiva que reconoce componentes de la superficie microbiana o MSCRAMM, por sus siglas en inglés) que se asocian a proteínas de unión del hospedador tales como fibrinógeno (unido por ClfA), las proteínas de unión a fibronectina (FnbA y FnbB), la proteína de unión al colágeno (CNA) y otras. Todas estas proteínas comparten la secuencia señal amino terminal que media el transporte a la superficie celular. Las MSCRAMM también incluyen un dominio A que es la región funcional que contiene el sitio activo para la unión al ligando (por ejemplo, fibrinógeno, fibronectina, elastina, queratina). El dominio A va seguido de una región compuesta de repeticiones de serina aspartato (repetición SD), que se cree que atraviesa la capa de peptidoglicano. La repetición de SD va seguida de una región que atraviesa la membrana que incluye el motivo LPXTG (SEQ ID NO: 125) para la unión covalente de la proteína al peptidoglicano. ClfA se describe en la patente de los EE.UU. N.º 6.008.341.

La región de unión a ligando de ClfA que comprende N1N2N3 del dominio A (Figura 1) abarca los aminoácidos 40-559. Los dominios N de ClfA se han asignado como se indica a continuación: N1 abarca los restos 45-220; N2 abarca los restos 229-369 y N3 abarca los restos 370-559. Véase Deivanayagam y col. *EMBO J.* 21:6660-6672 (2002). Para la facilidad de referencia los dominios N1N2N3 pueden denominarse N123, análogamente N2N3 puede denominarse N23. En las preparaciones de N1N2N3 recombinante, se ha descubierto que el dominio N1 es sensible a la proteasa y es fácilmente escindido o hidrolizado para dejar el N2N3 como un fragmento recombinante estable de unión a ligando. Véase Deivanayagam y col. *EMBO J.* 21:6660-6672 (2002). La estructura cristalina del fragmento N2N3 de unión a fibrinógeno del dominio A de ClfA, reveló que tanto N2 como N3 están dominados por cadenas beta antiparalelas. Además de las cadenas beta antiparalelas, el dominio N2 contiene una hélice alfa de una sola vuelta y dos hélices 3_{10} y el dominio N3 contiene tres hélices 3_{10}. Véase Deivanayagam y col. *EMBO J.* 21:6660-6672 (2002). La alineación de la secuencia de N2 y N3 revela solo un 13 % de identidad de secuencia y un 36 % de similitud de secuencia a lo largo de sus longitudes. Véase Deivanayagam y col. *EMBO J.* 21:6660-6672 (2002). La topología de los dominios N2 y N3 es similar al plegamiento de IgG clásico y se han propuesto como variantes nuevas del plegamiento de IgG. Véase Deivanayagam y col. *EMBO J.* 21:6660-6672 (2002).

En el presente documento se desvela una composición que comprende un polipéptido factor aglutinante A estable de *Staphylococcus aureus* ("ClfA"), y procedimientos para fabricar la misma, que es útil como una composición inmunogénica o vacuna. También se desvela en el presente documento una composición que comprende un polipéptido ClfA estable, un conjugado de PC5 y un conjugado de PC8 ("tri-antígeno"), y procedimientos para fabricar la misma, que es útil como composición inmunogénica o vacuna. En el presente documento se desvela adicionalmente una composición que comprende un polipéptido ClfA estable, un conjugado de PC5, un conjugado de PC8 y un polipéptido MntC ("tetra-antígeno"), y procedimientos para fabricar la misma, que es útil como composición inmunogénica o vacuna. Se sabe que ClfA es una proteína inestable, que experimenta fácilmente cortes entre los dominios N1 y N2. La presente solicitud se refiere a una formulación de ClfA que permite que N1N2N3 de ClfA permanezca sustancialmente sin degradar en condiciones de estrés aceleradas durante al menos tres meses. En algunas realizaciones, la formulación es una composición liofilizada que comprende menos del tres por ciento de agua. La expresión "composición liofilizada" se refiere a la formulación que tiene menos del 3 % de agua y no tiene por objeto limitar la composición al procedimiento por el que se hizo la composición, por ejemplo, liofilización o cualquier otro procedimiento de secado de una mezcla o de formación de compuestos de ingredientes secos. Por condiciones de estrés aceleradas, se entiende condiciones extremas de temperatura, pH y/o fuerza iónica, por lo general utilizadas para someter a ensayo la estabilidad de una formulación, tales como, por ejemplo, 37 ºC durante varias semanas o más.

Por tanto, en una realización, la divulgación se refiere a una composición estable que comprende una proteína ClfA sustancialmente sin degradar y agua a menos del tres por ciento. En una realización, la divulgación se refiere a una composición estable que comprende una proteína ClfA sustancialmente sin degradar, un conjugado de polisacárido capsular de tipo 5 (PC5), un conjugado de PC8 y agua a menos del tres por ciento. En una realización, la divulgación se refiere a una composición estable que comprende una proteína ClfA sustancialmente sin degradar, un conjugado de polisacárido capsular de tipo 5 (PC5), un conjugado de PC8, una proteína MntC y agua a menos del

tres por ciento. La proteína ClfA puede aislarse de cualquier cepa de *Staphylococcus* o puede ser un polipéptido recombinante. Un polipéptido ClfA recombinante puede tener una secuencia de tipo silvestre, puede comprender una o más mutaciones o puede ser al menos en un 90 % idéntica en secuencia de aminoácidos a una secuencia de tipo silvestre. Tabla 1 representa varias cepas de *S. aureus* y sus respectivas secuencias de ADN y proteínas de ClfA.

Tabla 1: cepas de ClfA y listados de secuencias

Cepa de ejemplo	ADN--ClfA	NT SEQ ID NO:	Proteína-ClfA	AA SEQ ID NO:	% de identidad con el antígeno
PFESA0131	clfA_001-1	61	clfA_001	62	99
PFESA0074	clfA_002-1	63	clfA_002	64	92
PFESA0072	clfA_003-1	65	clfA_003	66	99
PFESA0159	clfA_004-1	67	clfA_004	68	94
PFESA0154	clfA_005-1	69	clfA_005	70	91
PFESA0096	clfA_006-1	71	clfA_006	72	91
PFESA0269	clfA_007-1	73	clfA_007	74	91
PFESA0081	clfA_008-1	75	clfA_008	76	97
PFESA0005	clfA_009-1	77	clfA_009	78	95
PFESA0139	clfA_010-1	79	clfA_010	80	99
PFESA0237	clfA_011-1	81	clfA_011	82	100
PFESA0157	clfA_012-1	83	clfA_012	84	96
PFESA0069	clfA_013-1	85	clfA_013	86	92
PFESA0002	clfA_014-1	87	clfA_014	88	98
PFESA0147	clfA_015-1	89	clfA_015	90	91
PFESA0094	clfA_016-1	91	clfA_016	92	98
PFESA0143	clfA_017-1	93	clfA_017	94	97
PFESA0129	clfA_018-1	95	clfA_018	96	99
PFESA0128	clfA_019-1	97	clfA_019	98	92
PFESA0148	clfA_020-1	99	clfA_020	100	91
PFESA0140	clfA_021-1	101	clfA_021	102	98
PFESA0152	clfA_022-1	103	clfA_022	104	91
PFESA0141	clfA_023-1	105	clfA_023	106	96
PFESA0160	clfA_024-1	107	clfA_024	108	94

Secuencia de ClfA

El gen de la proteína factor aglutinante A, designado ClfA, se ha clonado, secuenciado y analizado en detalle a nivel molecular (McDevitt y col., *Mol. Microbiol*. 11: 237-248 (1994); McDevitt y col., *Mol. Microbiol.* 16: 895-907 (1995)). Los identificadores de secuencia para las secuencias de aminoácidos de ClfA de 111 aislados de *S. aureus* causantes de enfermedad se muestran en la Tabla 1. La secuencia de aminoácidos de ClfA de tipo silvestre de longitud completa (incluyendo la secuencia señal) de la cepa de *S. aureus* PFESA0237, se muestra en la SEQ ID NO: 130. Esta secuencia muestra una tirosina en la posición 338, que cambia a una alanina en la forma mutada de ClfA. El gen de longitud completa que codifica la ClfA de tipo silvestre de la cepa PFESA0237 de *S. aureus*, que comprende la región N123, la región de repetición y la región de anclaje se muestra en la SEQ ID NO: 131. Se muestra la secuencia de aminoácidos de las formas mutadas Y338A de ClfA en la SEQ ID NO: 123. Sin embargo, ha de señalarse que el cambio de una tirosina por una alanina, que se produce en la ClfA de tipo silvestre en la posición 338 de la SEQ ID NO: 130 y que se designa como Y338A, se muestra en la forma mutada de ClfA, en la SEQ ID NO: 123 en la posición 310. Además, la forma mutada de ClfA que se muestra en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 123 es la forma madura de ClfA sin la secuencia señal, lo que explica la diferencia en la posición de esta mutación entre la SEQ ID NO: 130 y SEQ ID NO: 123.

En una realización, la proteína ClfA es comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 123, que comprende una mutación Y388A que suprime la unión a fibrinógeno.

En algunas realizaciones, la proteína ClfA no necesita ser de longitud completa y puede consistir en los aminoácidos 50-597 (como se numeran de acuerdo con la SEQ ID NO: 130 pero que pueden basarse en cualquier proteína ClfA).

En algunas realizaciones, la proteína ClfA comprende o consiste esencialmente en un dominio N1, un dominio N2, y un dominio N3. En algunas realizaciones, la proteína ClfA comprende un dominio N. Por dominio N, lo que se entiende es un dominio N1, un dominio N2 o un dominio N3.

Se describen proteínas ClfA, sus procedimientos de fabricación y uso se describen en la solicitud de patente relacionada Solicitud de Patente de los EE.UU. número de serie 61/219,134, presentada el 22 de junio de 2009. También se describen proteínas ClfA en la Solicitud de Patente Internacional N.º PCT/US2010/039510.

Por estable, lo que se entiende es que la ClfA permanece sustancialmente sin degradar en condiciones de estrés aceleradas u otras y durante períodos prolongados de tiempo, tal como en el almacenamiento. Por sustancialmente sin degradar, lo que se entiende es que al menos el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 95 % o el 99 % de la población total acumulada de polipéptidos ClfA contiene polipéptidos que comprenden secuencias N1 y secuencias adicionales de N2 y/o N3. Por intacta, lo que se quiere decir es que la proteína ClfA contiene al menos los dominios N1, N2 y N3. En algunas realizaciones, la ClfA permanece estable durante al menos dos semanas, al menos un mes o al menos tres meses a 37 ºC.

En algunas realizaciones, una composición liofilizada de la divulgación contiene una ClfA intacta en una cantidad que es menor que uno por ciento en peso del peso total de la composición inmunogénica liofilizada (1 % [p/p]). En algunas realizaciones, la ClfA está en una cantidad entre el 0,09 % ± el 0,027 % y el 0,85 % ± el 0,26 %.

ClfB: organización del dominio

ClfB es una proteína de *S. aureus* que tiene actividad de unión a fibrinógeno e induce que el *S. aureus* forme grumos en presencia de plasma. ClfB es una proteína MSCRAMM y muestra la organización del dominio MSCRAMM característica incluyendo un dominio A que es la región funcional que contiene el sitio activo para la unión del ligando (por ejemplo, fibrinógeno, fibronectina, elastina, queratina). El Dominio A va seguido de una región compuesta de repeticiones de serina aspartato (repetición SD), que se cree que atraviesa la capa de peptidoglicano. La repetición SD va seguida de una región que atraviesa la membrana que incluye el motivo LPXTG (SEQ ID NO: 125) para el enlace covalente de la proteína al peptidoglicano. ClfB se describe en el documento WO 99/27109 y en la patente de los EE.UU. 6.680.195.

La organización interna del dominio A N-terminal de ClfB es muy similar a la organización que se encuentra en ClfA. El dominio A se compone de tres subdominios N1, N2 y N3. La región de unión al ligando de ClfB que comprende N1N2N3 del dominio A abarca los aminoácidos 44-585. Para facilidad de referencia los dominios N1N2N3 pueden denominarse N123, así mismo N2N3 puede denominarse N23. Los dominios N de ClfB se han asignado como se indica a continuación: N1 abarca los restos 44-197; N2 abarca los restos 198-375 y N3 abarca los restos 375-585. En ClfA, se descubrió que la estructura cristalina del dominio A tiene una versión única del plegamiento de inmunoglobulina y, por analogía, puede especularse que se de el mismo caso para ClfB. Véase Deivanayagam y col., *EMBO J.* 21:6660-6672 (2002). Aunque la organización de los dominios A de ClfB y ClfA son similares, la identidad de secuencia es solo del 26 %. Véase Ni Eidhin y col., *Mol. Microbiol*. 30:245-257 (2002).

Secuencia de ClfB

El gen que codifica ClfB se clasifica como un gen de adhesión del núcleo. Se resumen secuencias de ClfB de 92 cepas de *S. aureus* asociada a a múltiples patologías en la Figura 42. Se obtuvieron secuencias adicionales de GenBank.

Otros MSCRAMMS

Pueden considerarse otros MSCRAMM para su uso en una composición inmunogénica de la presente invención. Por ejemplo, las proteínas de repetición de serina-aspartato (Sdr), SdrC, SdrD y SdrE están relacionadas en la secuencia primaria y organización estructural con las proteínas ClfA y ClfB y se localizan en la superficie celular. Las proteínas SdrC, SdrD y SdrE son proteínas asociadas a la pared celular, que tienen una secuencia señal en el extremo N y un motivo LPXTG (SEQ ID NO: 125), un dominio hidrofóbico y restos cargados positivamente en el extremo C. Cada uno también tiene una región R que contiene repeticiones SD de longitud suficiente para permitir, junto con los motivos B, la expresión eficiente de la región A del dominio de unión al ligando en la superficie celular. Situándose la región A de las proteínas SdrC, SdrD y SdrE en la superficie celular, las proteínas pueden interactuar con las proteínas en el plasma, la matriz extracelular o con moléculas en la superficie de células hospedadoras. Las proteínas Sdr comparten cierta similitud de secuencia de aminoácidos limitada con ClfA y ClfB. Al igual que ClfA y ClfB, SdrC, SdrD y SdrE también presentan unión al ligando dependiente de cationes de las proteínas de la matriz extracelular.

Los genes sdr están estrechamente unidos y dispuestos en tándem. Las proteínas Sdr (de SdrC, SdrD, SdrE, C1fA y ClfB) comprenden característicamente una región A donde existe una secuencia de aminoácidos altamente conservada que puede utilizarse para derivar un motivo TYTFTDYVD de consenso (SEQ ID NO: 126) motivo. El motivo presenta una ligera variación entre las diferentes proteínas. Esta variación, junto con la secuencia de consenso del motivo, se describe en la Patente de los EE.UU. 6.680.195. En las proteínas Clf-Sdr, este motivo está altamente conservado. El motivo puede utilizarse en composiciones inmunogénicas para transmitir un amplio

espectro de inmunidad a infecciones bacterianas y también puede utilizarse como antígeno en la producción de anticuerpos monoclonales o policlonales. Puede utilizarse un anticuerpo de este tipo para transmitir inmunidad pasiva de amplio espectro.

Las proteínas Sdr difieren de ClfA y ClfB por tener de dos a cinco secuencias repetidas de 110-113 restos (motivos B) adicionales situadas entre la región A y la región R. Cada motivo B contiene un bucle de mano EF de unión a Ca^{2+} de consenso que normalmente se encuentra en las proteínas eucariotas. Se demostró por análisis de fluorescencia bisANS que la integridad estructural de una proteína recombinante que comprende las cinco repeticiones B de SdrD es dependiente de Ca^{2+}, lo que señala que las manos EF son funcionales. Cuando se retiró el Ca^{2+} la estructura colapsó a una conformación desplegada. La estructura original se restauró por adición de Ca^{2+}. Los dominios R C-terminales de las proteínas Sdr contienen 132-170 restos SD. Estos van seguidos de regiones de anclaje a la pared conservadas características de muchas proteínas superficiales de bacterias grampositivas.

En las proteínas Sdr y Clf este motivo B está altamente conservado mientras que se produce una versión degenerada en las MSCRAMM de unión a fibronectina, así como la proteína de unión a colágeno Cna. Los motivos B, en conjunción con las regiones R, son necesarios para la exposición del dominio de unión a ligando a cierta distancia de la superficie celular. Los motivos repetidos B son un denominador común del subgrupo de proteínas con repeticiones SD descritas en el presente documento. Estos motivos se encuentran en diferente número en las tres proteínas Sdr de la cepa PFESA0237. Existe claras distinciones entre los motivos B individuales. Las unidades más conservadas son las situadas adyacentes a las regiones R (SdrC B2, SdrD B5 y SdrE B3). Se diferencian del resto en varios sitios, especialmente en la mitad C-terminal. Un detalle estructural notable es que las repeticiones B adyacentes siempre están separadas por un resto de prolina presente en la región C-terminal, pero nunca aparece una prolina entre las últimas repeticiones B y la región R. En cambio, este engarce se caracteriza por un tramo ácido corto. Estas diferencias evidencian que las unidades terminales tienen un papel estructural o funcional diferente en comparación con los otros motivos B. Los motivos B N-terminales de SdrD y SdrE se han separado de los demás y existen numerosas alteraciones de aminoácidos, incluyendo pequeñas inserciones y deleciones, mientras que los motivos B internos restantes están más altamente conservados. Nótese que cada una de las tres proteínas Sdr tiene al menos un motivo B de cada tipo.

Los dominios R C-terminales de las proteínas Sdr contienen 132-170 restos SD. Estos van seguidos de regiones de anclaje a la pared conservadas característicos de muchas proteínas superficiales de bacterias grampositivas.

Otras moléculas SdrD candidatas pueden derivar de diversas especies de organismos para su uso en una composición inmunogénica de la invención, algunas de los cuales incluyen las siguientes SdrD de *S. aureus:* cepa USA300 FPR3757 (proteína número de referencia SAUSA300 0547); cepa NCTC8325 (proteína número de referencia SAOUHSC 00545); cepa MW2 (proteína número de referencia MW0517); cepa MSSA476 (proteína número de referencia SAS0520; y cepa Mu50 (proteína número de referencia SAV0562).

MSCRAMM adicionales que pueden considerarse para su uso en una composición inmunogénica de la presente invención incluyen EkeS, DsqA, KesK, KrkN, KrkN2, RkaS, RrkN y KnkA. Estas MSCRAMM se describen en el documento WO 02/102829. MSCRAMM adicionales, identificadas por números de referencia de GenBank, incluyen NP_373261.1, NP_373371.1, NP_374246.1, NP_374248.1, NP_374841.1, NP_374866.1, NP_375140.1, NP_375614.1, NP_375615.1, NP_375707.1, NP_375765.1 y NP_375773.1.

Polisacáridos de la cápsula de tipo 5 y tipo 8

Los microorganismos estafilocócicos capaces de provocar una enfermedad invasiva generalmente también son capaces de producir un polisacárido capsular (PC) que encapsula la bacteria y potencia su resistencia a la eliminación por el sistema inmunitario innato del hospedador. El PC sirve para cubrir la célula bacteriana con una cápsula protectora que vuelve a las bacterias resistentes a la fagocitosis y a la destrucción intracelular. Las bacterias que carecen de una cápsula son más susceptibles a la fagocitosis. Los polisacáridos capsulares son con frecuencia un factor de virulencia importante para muchos patógenos bacterianos, incluyendo *Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae* y estreptococos del grupo B.

El polisacárido de la cápsula puede utilizarse para serotipar una especie particular de bacterias. El tipado por lo general se consigue mediante la reacción con un antisuero específico o un anticuerpo monoclonal generado para una estructura específica o un epítopo único característico del polisacárido de la cápsula. Las bacterias encapsuladas tienden a crecer en colonias lisas mientras que las colonias de bacterias que han perdido sus cápsulas tienen aspecto rugoso. Las colonias que producen un aspecto mucoide se conocen como Fuertemente Encapsuladas. Tipos 1 y 2 *de S. aureus* están fuertemente encapsulados y rara vez se asocian con la enfermedad.

La mayoría de los aislados clínicos de *S. aureus* están encapsulados ya sea con los serotipos 5 u 8. Los polisacáridos capsulares de tipo 5 (PC5) y de tipo 8 (PC8) tienen unidades de repetición de trisacáridos similares compuestas de ácido N-acetil manosaminurónico, N-acetil L-fucosamina y N-acetil D-fucosamina. Véase Fournier, J.M. y col., *Infect. Immun*. 45:97-93 (1984) y Moreau, M. y col., *Carbohydrate Res*. 201:285-297 (1990). Los dos PC, que tienen los mismos azúcares, pero difieren en los enlaces de azúcar y en los sitios de O-acetilación, producen cada uno patrones de inmunorreactividad serológicamente distintos.

En algunas realizaciones, los polisacáridos capsulares del serotipo 5 y/u 8 de la invención están O-acetilados. En algunas realizaciones, el grado de O-acetilación del polisacárido u oligosacárido capsular de tipo 5 es del 10-100 %, del 20-100 %, del 30-100 %, del 40-100 %, del 50-100 %, del 60-100 %, del 70-100 %, del 80-100 %, del 90-100 %, del 50-90 %, del 60-90 %, del 70-90 % o del 80-90 %. En algunas realizaciones, el grado de O-acetilación del polisacárido u oligosacárido capsular de tipo 8 es del 10-100 %, del 20-100 %, del 30-100 %, del 40-100 %, del 50-100 %, del 60-100 %, del 70-100 %, del 80-100 %, del 90-100 %, del 50-90 %, del 60-90 %, del 70-90 % o del 80-90 %. En algunas realizaciones, el grado de O-acetilación de los polisacáridos u oligosacáridos capsulares de tipo 5 y de tipo 8 es del 10-100 %, del 20-100 %, del 30-100 %, del 40-100 %, del 50-100 %, del 60-100 %, del 70-100 %, del 80-100 %, del 90-100 %, del 50-90 %, del 60-90 %, del 70-90 % o del 80-90 %.

El grado de O-acetilación del polisacárido u oligosacárido puede determinarse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, mediante RMN de protón (Lemercinier y Jones 1996, *Carbohydrate Research* 296; 83-96, Jones y Lemercinier 2002, *J Pharmaceutical y Biomedical Analysis* 30; 1233-1247, documento WO 05/033148 o documento WO 00/56357). Otro procedimiento utilizado habitualmente es descrito por Hestrin (1949) *J. Biol. Chem*. 180; 249-261.

En algunas realizaciones, los polisacáridos capsulares del serotipo 5 y/u 8 de la invención se usan para generar anticuerpos que son funcionales como se mide por la destrucción de bacterias en un modelo de eficacia animal o en un ensayo de destrucción opsonofagocítica que demuestra que los anticuerpos destruyen las bacterias. Dicha funcionalidad puede no observarse utilizando un ensayo que monitorice la generación de anticuerpos solamente, lo que no es indicativo de la importancia de la O-acetilación en la eficacia.

Epidemiología de la cápsula

La asociación de determinados serotipos de la cápsula con la enfermedad es posible a través del control de aislados clínicos. De los ocho serotipos diferentes de *S. aureus* identificadas (Karakawa y Vann (1982)), solo los serotipos 1 y 2 están fuertemente encapsulados y éstos rara vez se aíslan. Véase *Capsular Polysaccharides of Staphylococcus aureus*, p. 285-293, en J.B. Robbins, J.C. Hill y J.C. Sadoff (ed.), *Seminars in infectious disease, vol. 4, Bacterial Vaccines*. Thieme Stratton, Inc. Nueva York. Las investigaciones han demostrado que aproximadamente el 85-90 % de los aislados clínicos de *S. aureus* expresan PC5 o PC8 (Arbeit RD y col., *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* (1984) Abril; 2(2):85-91; Karakawa WW y col., *J. Clin. Microbiol*. (1985) Septiembre; 22(3):445-7; Essawi T y col., *Trop. Med. Int. Health* (1998) Julio; 3(7):576-83; Na'was T y col., *J. Clin. Microbiol*. (1998) 36(2):414-20). La mayor parte de las cepas no tipables de PC5 y PC8 son genéticamente de tipo 5 o de tipo 8 que contienen mutaciones en el locus *ca5/8* (Cocchiaro, Gómez y col., (2006), *Mol. Microbiol. Feb.* 59(3):948-960). El encapsulado para algunas cepas se pierde rápidamente a los pocos pases *in vitro*, lo que es debido a un efecto represor de la alta concentración de fosfato en los medios utilizados en el diagnóstico clínico de la producción de la cápsula. También se notificó que los aislados no encapsulados recuperan la expresión de la cápsula después de pasar por las vacas. Véase Opdebeck, J.P. y col., *J. Med. Microbiol*. 19:275-278 (1985). Algunas cepas no tipables se convierten en cápsula-positivas en condiciones de crecimiento adecuadas.

Estructura de PC5 y PC8

La unidad de repetición tanto de PC5 como de PC8 se compone de ácido 2-acetamido-2-desoxi-D-manurónico, 2-acetamido-2-desoxi-L-fucosa y 2-acetamido-2-desoxi-D-fucosa. Véase C. Jones y col., *Carbohydr. Res*. 340:1097-1106 (2005). Aunque PC5 y PC8 tienen la misma composición de azúcar, se ha demostrado que son inmunológicamente distintos. Se diferencian en enlaces glicosídicos y en el sitio de O-acetilación de ácido urónico. Se observó la N-acetilación incompleta dependiente de la cepa de uno de los restos FucNAc. Véase Tzianabos y col., *PNAS* V98: 9365 (2001).

Polisacárido de la cápsula de S. aureus en una composición inmunogénica

El peso molecular de los polisacáridos de la cápsula de *S. aureus* es una consideración importante para su uso en composiciones inmunogénicas. Los polisacáridos de la cápsula de alto peso molecular son capaces de inducir ciertas respuestas inmunitarias de anticuerpos debido a una valencia más alta de los epítopos presentes en la superficie antigénica. Los procedimientos que se describen en el presente documento prevén el aislamiento y la purificación de polisacárido de la cápsula de tipo 5 y de tipo 8 de mucho mayor peso molecular que el que estaba disponible anteriormente.

MntC/SitC/Proteína de unión a la Saliva

La MntC/SitC/Proteína de unión a la Saliva es una proteína transportadora ABC y tiene homólogos en *S. epidermidis* y *S. aureus.* En la presente invención se denomina MntC. Esta proteína es una lipoproteína de 32 kDa y se encuentra en la pared celular bacteriana. Véase Sellman y col. y Cockayne y col., *Infect. Immun*. 66:3767 (1998). En *S. epidermidis,* es un componente de un operón regulado por hierro. Presenta una considerable homología con ambas adhesinas incluyendo FimA de *S. parasanguis y* con las lipoproteínas de una familia de transportadores ABC con funciones de transporte de hierro metálico probadas o supuestas. (Véase la Tabla 2 para las cepas de *S. aureus* y las secuencias.)

Proteína MntC de S. aureus

El homólogo de *S. aureus* de MntC es conocido como proteína de unión a la saliva y se desveló en la Patente de los EE.UU. N.º 5.801.234 y puede incluirse en una composición inmunogénica de la invención. La secuencia de proteína para el homólogo de *S. aureus* de MntC/SitC/Proteína de unión a la Saliva se encuentra en GenBank número de referencia NP_371155 para la cepa Mu50 (también conocida como SAV0631). El identificador de secuencia es SEQ ID NO: 134. El número de referencia para la secuencia de nucleótidos para el genoma completo de la cepa Mu50 es NC_002758.2. Las coordenadas para la secuencia de ADN codificante para la secuencia de proteína que se encuentra en el número de referencia de GenBank NP_371155 son 704988-705917 (SEQ ID NO: 135). En ciertas realizaciones, el extremo N de MntC se escinde como se muestra en SEQ ID NO: 119 (secuencia de polipéptidos) y SEQ ID NO: 136 (secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido). Las secuencias de MntC de diferentes cepas de *S. aureus* se resumen en la Figura 43.

Proteína SitC de S. epidermidis

El homólogo de *S. epidermidis* de MntC/SitC/Proteína de unión a la Saliva se conoce como SitC y se desveló en Sellman y col., (Sellman y col., *Infect. Inmun.* octubre de 2005; 73(10):6591-6600). La secuencia de proteína para el homólogo de *S. epidermidis* de MntC/SitC/Proteína de unión a la Saliva se encuentra en el número de referencia de GenBank YP_187886.1 (también conocido como SERP0290). El identificador de secuencia es SEQ ID NO: 132.

El número de referencia para la secuencia de nucleótidos para el genoma completo de la cepa RP62A, es NC_002976. Las coordenadas para la secuencia de ADN codificante de la secuencia de proteína que se encuentra en el número de referencia de GenBank YP_187886.1 son 293030-293959 (SEQ ID NO: 133). La correspondiente versión truncada del extremo N de SitC se muestra en SEQ ID NO: 121 (secuencia de polipéptidos) y SEQ ID NO: 137 (secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido). Otras moléculas de SitC candidatas pueden derivar de diversas especies de organismos para su uso en una composición inmunogénica de la invención, algunos de los cuales se enumeran en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2

Proteína	Especie	Cepa de ejemplo	Proteína de referencia
SitC	S. haemolyticus	JCSC1435	BAE03450.1
SitC	S. epidermidis	ATCC 12228	AA004002.1
SitC	S. saprophyticus	ATCC 15305	BAE19233.1
SitC	S. xylosus	DSM20267	ABR57162.1
SitC	S.carnosus	TM300	CAL27186.1

Proteínas de unión a hierro de *S. aureus*

Otros antígenos candidatos potenciales que se consideran para su uso en las composiciones inmunogénicas de la invención incluyen el determinante B de superficie regulado por hierro (IsdB) de la proteína de superficie de *S. aureus*. Esta MSCRAMM fue descrita por Mazmanian y col. (Mazmanian, SK y col. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, EE.UU. 99:2293-2298 (2002)) y posteriormente se sometió a ensayo y se demostró que era eficaz como candidato de una vacuna en un modelo murino de infección y en un estudio de inmunogenicidad en macaco de la India de Kuklin y col. (Kuklin, NA y col. *Infection and Immunity*, Vol. 74, n.º 4, 2215-2223, (2006)). Esta molécula IsdB está presente en varias cepas de *S. aureus,* incluyendo la cepa SARM252 (proteína número de referencia CAG40104.1); la cepa Newman (proteína número de referencia BAF67312.1); la cepa MSSA476 (proteína número de referencia CAG42837.1); la cepa Mu3 (proteína número de referencia BAF78003.1); la cepa RF122 (proteína número de referencia CAI80681.1).

Antígenos candidatos:

Las composiciones inmunogénicas de la presente invención también pueden incluir uno o más de los siguientes antígenos: Opp3a, DltD, HtsA, LtaS, IsdA, IsdC, SdrF, SdrG, SdrH, SrtA, SpA, Sbi, alfa-hemolisina (hla), beta-hemolisina, proteína de unión a fibronectina A (fnbA), proteína de unión a fibronectina B (fnbB), coagulasa, Fig, mapa, leucocidina Panton-Valentine (pvl), toxina alfa y sus variantes, toxina gamma (hlg) y variantes, ica, transportador ABC inmunodominante, transportador de Mg^{2+}, transportador Ni ABC, RAP, autolisina, receptores de laminina, IsaA/PisA, IsaB/PisB, SPOIIIE, SsaA, EbpS, Sas A, SasF, SasH, EFB (FIB), SBI, Npasa, EBP, sialo proteína de unión al hueso II, precursor de aureolisina (AUR)/Sepp1, Cna y fragmentos de los mismos, tales como M55, TSST-1, mecA, exopolisacárido de poli-N-acetilglucosamina (PNAG/dPNAG), GehD, EbhA, EbhB, SSP-1, SSP-2, HBP, proteína de unión a vitronectina, Hara, EsxA, EsxB, enterotoxina A, enterotoxina B, enterotoxina C1 y autolisina nueva. En ciertas realizaciones de la invención, cuando la composición inmunogénica comprende ciertas formas de PC5 y/o PC8, puede no comprender adicionalmente PNAG.

Formulaciones de composición inmunogénica

En una realización, las composiciones inmunogénicas liofilizadas de la divulgación comprenden adicionalmente al menos uno de un adyuvante, un tampón, un crioprotector, una sal, un catión divalente, un detergente no iónico, un inhibidor de la oxidación de radicales libres, un agente de carga o un vehículo.

Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden comprender adicionalmente uno o más conservantes, además de una pluralidad de antígenos de proteínas estafilocócicas y conjugados polisacárido capsular-proteína. La FDA exige que los productos biológicos en viales de dosis múltiples (multidosis) contengan un conservante, con solo unas pocas excepciones. Los productos de vacuna que contienen conservantes incluyen vacunas que contienen cloruro de bencetonio (ántrax), 2-fenoxietanol (DTTa, HepA, Lyme, poliomielitis (parenteral)), fenol (neumonía, fiebre tifoidea (parenteral), viruela vacunoide) y timerosal (DTTa, DT, Td, HepB, Hib, gripe, JE, meningitis, neumonía, rabia). Los conservantes aprobados para su uso en fármacos inyectables incluyen, por ejemplo, clorobutanol, m-cresol, metilparabeno, propilparabeno, 2-fenoxietanol, cloruro de bencetonio, cloruro de benzalconio, ácido benzoico, alcohol bencílico, fenol, timerosal y nitrato fenilmercúrico.

Las formulaciones de la invención pueden comprender adicionalmente uno o más de un tampón, una sal, un catión divalente, un detergente no iónico, un crioprotector tal como un azúcar, un agente de carga y un antioxidante tal como un agente neutralizante de radicales libres o agente quelante o cualquier combinación múltiple de los mismos. La elección de cualquier componente, por ejemplo, un quelante, puede determinar si es deseable o no otro componente (por ejemplo, un agente neutralizante). La composición final formulada para la administración debería ser estéril y/o apirógena. El experto en la materia puede determinar empíricamente qué combinaciones de estos y otros componentes serán óptimas para su inclusión en las composiciones inmunogénicas de la invención que contienen conservantes dependiendo de una diversidad de factores tales como las condiciones de almacenamiento y de administración particulares requeridas.

En algunas realizaciones, la composición liofilizada contiene adicionalmente un tampón que tiene un pKa de 6,0 ± 0,6 en una cantidad que es inferior al **3 %** (p/p). En ciertas realizaciones, la formulación se almacena temporalmente dentro de un intervalo de pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 9,0, preferentemente de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 7,5. En algunas realizaciones, el tampón está a una concentración del 2,54 % ± el 0,76 % (p/p). En algunas realizaciones, el tampón comprende succinato a pH 6,0 ± 0,6. En algunas realizaciones, el tampón comprende histidina a pH 6,0 ± 0,6. En algunas realizaciones, el tampón comprende histidina a pH 6,5 ± 0,6. La Tabla 3 enumera algunos ejemplos no limitantes de tampones que pueden utilizarse en la práctica de la presente invención.

Tabla 3: Tampones

Tampón	Intervalo de pH	pKa
maleato	4,0-6,0	5,13
piridina	4,9-5,9	5,23
piperazina (pK1)	5,0-6,0	5,33
cacodilato	5,0-7,4	6,27
succinato	5,5-6,5	5,64
MES	5,5-6,7	6,10
citrato	5,5-7,2	6,40
maleato	55-7,2	6,24
histidina	5,5-7,4	1,70, 6,04, 9,09
bis-tris	5,8-7,2	6,46
fosfato	5,8-8,0	7,20
ADA	6,0-7,2	6,59
carbonato	6,0-8,0	6,35

En ciertas realizaciones, puede ser deseable ajustar el pH de la composición o formulación inmunogénica liofilizada de la divulgación. El pH de una formulación de la invención puede ajustarse utilizando técnicas convencionales en la técnica. El pH de la formulación puede ajustarse para que esté entre 3,0 y 8,0, En ciertas realizaciones, el pH de la formulación puede estar o puede ajustarse para que esté, entre 3,0 y 6,0, 4,0 y 6,0, 5,0 y 7,0 o 5,0 y 8,0, En otras realizaciones, el pH de la formulación puede ser o puede ajustarse para que sea, aproximadamente 3,0, aproximadamente 3,5, aproximadamente 4,0, aproximadamente 4,5, aproximadamente 5,0, aproximadamente 5,5, aproximadamente 5,8, aproximadamente 6,0, aproximadamente 6,5, aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,5 o aproximadamente 8,0. En ciertas realizaciones, el pH puede estar o puede ajustarse para que esté, en un intervalo de 4,5 a 7,5 o de 4,5 a 6,5, de 5,0 a 5,4, de 5,4 a 5,5, de 5,5 a 5,6, de 5,6 a 5,7, de 5,7 a 5,8, de 5,8 a 5,9, de 5,9 a 6,0, de 6,0 a 6,1, de 6,1 a 6,2 de 6,2 a 6,3, de 6,3 a 6,4, de 6,4 a 6,5, de 6,5 a 6,6, de 6,6 a 6,7, de 6,7 a 6,8, de 6,8

a 6,9, de 6,9 a 7,0, de 6,5 a 7,0, de 7,0 a 7,5 o de 7,5 a 8,0. En una realización específica, el pH de la formulación es de aproximadamente 6,0. En una realización específica, el pH de la formulación es de aproximadamente 6,5.

En algunas realizaciones, la composición inmunogénica liofilizada comprende un agente de carga. El agente de carga sirve generalmente para proporcionar volumen a la composición y facilitar la visualización del fármaco, que generalmente está en cantidades por dosis tan bajas que el sedimento seco de un fármaco es invisible o casi invisible, y/o evita el escape de ingredientes activos del vial, tal como durante la liofilización. El agente de carga también puede servir para facilitar la precipitación del agente farmacológico. Los agentes de carga también pueden servir como crioprotectores. Se describe una diversidad de crioprotectores en textos convencionales, tales como *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Vol. 2, 19ª edición (1995).

Los ejemplos no limitantes de agentes de carga incluyen alcoholes de azúcar, tales como alditol, manitol, sorbitol, inositol y polietilenglicol, ácidos de azúcar, tales como ácido aldónico, ácido urónico y ácido aldárico, e hidratos de carbono, tales como aldosas, cetosas, amino azúcares, alditoles, inositoles, ácidos aldónicos, ácidos urónicos, ácidos aldáricos, mono-, di- o poli-, hidratos de carbono, gliceraldehído, arabinosa, lixosa, pentosa, ribosa, xilosa, galactosa, glucosa, hexosa, idosa, manosa, talosa, heptosa, glucosa, fructosa, ácido glucónico, sorbitol, lactosa, manitol, a-glucopiranósido de metilo, maltosa, ácido isoascórbico, ácido ascórbico, lactona, sorbosa, ácido glucárico, eritrosa, treosa, arabinosa, alosa, altrosa, gulosa, idosa, talosa, eritrulosa, ribulosa, xilulosa, psicosa, tagatosa, ácido glucurónico, ácido glucónico, ácido glucárico, ácido galacturónico, ácido manurónico, glucosamina, galactosamina, sacarosa, trehalosa, ácido neuramínico, arabinanos, fructanos, fucanos, galactanos, galacturonanos, glucanos, mananos, xilanos (tales como, por ejemplo, inulina), levano, fucoidano, carragenano, galactocarolosa, pectinas, ácidos pécticas, amilosa, pululano, glicógeno, amilopectina, celulosa, dextrano, pustulano, quitina, agarosa, queratina, condroitina, dermatano, ácido hialurónico, ácido algínico, goma de xantano o almidón.

En algunas realizaciones, el agente de carga es uno cualquiera o más de sacarosa, manitol, glicina y sorbitol. En algunas realizaciones, el agente de carga es sacarosa. En algunas realizaciones, la sacarosa está en más del 91 % (p/p). En algunas realizaciones, la sacarosa está al 96 % ± el 2,0 % (p/p).

En ciertas realizaciones, una formulación de la composición liofilizada, liofilizada o reconstituida, que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más cationes divalentes, incluyendo, pero no limitados a, $MgCl_2$, $CaCl_2$ y $MNCI_2$, a una concentración que varía de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 10 mM, prefiriéndose hasta aproximadamente 5 mM.

En ciertas realizaciones, una formulación de la composición liofilizada, liofilizada o reconstituida, que es compatible con la administración parenteral comprende una o más sales, incluyendo pero no limitadas a cloruro de sodio, cloruro de potasio, sulfato de sodio y sulfato de potasio, presentes en una fuerza iónica que sea fisiológicamente aceptable para el sujeto después de la administración parenteral e incluidas a una concentración final para producir una fuerza iónica u osmolaridad de la formulación final seleccionadas. La fuerza iónica u osmolalidad finales de la formulación estarán determinadas por múltiples componentes (por ejemplo, los iones del compuesto o compuestos tamponantes y otras sales no tamponantes. Una sal preferida, NaCl, está presente en un intervalo de hasta aproximadamente 250 mM, seleccionándose las concentraciones de sal para complementar otros componentes (por ejemplo, azúcares) de manera que la osmolaridad total final de la formulación sea compatible con la administración parenteral (por ejemplo, intramuscular o subcutánea) y promoverán la estabilidad a largo plazo de los componentes inmunogénicos de la formulación de composición inmunogénica en diversos intervalos de temperatura. Las formulaciones sin sales tolerarán intervalos mayores de los uno o más crioprotectores seleccionados para mantener los niveles de osmolaridad final deseados.

En ciertas realizaciones, una formulación de la composición liofilizada, liofilizada o reconstituida, que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más crioprotectores seleccionados entre, pero no limitados a disacáridos (por ejemplo, lactosa, maltosa, sacarosa o trehalosa) e hidrocarburos polihidroxilados (por ejemplo, dulcitol, glicerol, manitol y sorbitol).

En ciertas realizaciones, la osmolaridad de una formulación liofilizada reconstituida se encuentra en un intervalo de aproximadamente 200 mOs/l a aproximadamente 800 mOs/l, con un intervalo preferido de aproximadamente 250 mOs/l a aproximadamente 500 mOs/l o de aproximadamente 300 mOs/l a aproximadamente 400 mOs/l. Una formulación liofilizada reconstituida puede contener, por ejemplo, de aproximadamente el 0 % a aproximadamente el 25 % de sacarosa, de aproximadamente el 3 % a aproximadamente el 15 % y de aproximadamente el 5 a aproximadamente el 10 % de sacarosa. Como alternativa, una formulación liofilizada reconstituida puede contener, por ejemplo, de aproximadamente el 3 % a aproximadamente el 12 % de sorbitol. Si se añade una sal tal como cloruro de sodio, entonces, el ámbito eficaz de la sacarosa o el sorbitol puede diminuir relativamente o no. Estas y otras osmolaridades y consideraciones acerca de la osmolalidad están bien dentro de la experiencia de la técnica.

En ciertas realizaciones, una formulación liofilizada, liofilizada o reconstituida, de la divulgación que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más inhibidores de la oxidación de radicales libre y/o agentes quelantes. Se conocen en la técnica una diversidad de neutralizantes de radicales libres y quelantes y son aplicables a las formulaciones y procedimientos de uso descritos en el presente documento. Los ejemplos incluyen pero no se limitan a etanol, EDTA, una combinación de EDTA/etanol, trietanolamina, manitol, histidina, glicerol, citrato de sodio,

hexafosfato de inositol, tripolifosfato, ácido ascórbico/ascorbato, ácido succínico/succinato, ácido málico/maleato, desferal, EDDHA y DTPA y diversas combinaciones de dos o más de los anteriores. En ciertas realizaciones, puede añadirse al menos un neutralizante de radicales libres no reductor a una concentración que potencie eficazmente la estabilidad a largo plazo de la formulación. También puede añadirse uno o más inhibidores de la oxidación de radicales libres/quelantes en diversas combinaciones, tales como un agente de neutralizante y un catión divalente. La elección de quelante determinará si es necesaria o no la adición de un agente neutralizante.

En algunas realizaciones, la composición inmunogénica liofilizada comprende un tensioactivo a menos del 0,5 % (p/p). En algunas realizaciones, el tensioactivo está al 0,21 % ± el 0,04 % (p/p). Los tensioactivos tienen múltiples papeles no limitantes en las formulaciones, incluyendo, por ejemplo, como adyuvante, como emulsionante y como solubilizante. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el tensioactivo actúa como solubilizante para evitar que la sustancia farmacológica, es decir, la proteína ClfA, se adhiera a las paredes de un recipiente o jeringuilla y que, por tanto, no se recupere o entregue. Los tensioactivos también se utilizan para prevenir que se produzca una posible agregación tal como, por ejemplo, cuando y si la proteína ClfA entra en contacto con una lubricación de silicona de los tapones. Se describen tensioactivos para su uso en composiciones inmunogénicas y vacunas en Ascarateil y Dupuis, *Vaccine*, 24(2006): S83-S85. En resumen, los tensioactivos no limitantes incluyen lipopolisacáridos (LPS), saponinas, bromuro de dimetil dioctadecil amonio (DDAB), polímeros de bloque o poloxámeros, que son polímeros aleatorios de óxido de etileno (EO) y óxido de propileno (PO), ésteres de sorbitano, que puede ser mono o tri-oleato de sorbitano y que están hechos de sorbitol y un ácido oleico unidos por enlaces éster y los etoxilados (por ejemplo, polisorbatos, tales como, por ejemplo, polisorbato 80), fosfolípidos tales como lecitina y oleatos de manida, que son ésteres de ácido oleico y manitol.

En algunas realizaciones, el tensioactivo es uno cualquiera o más de un poloxámero, un polioxietilen alquil éter incluyendo, pero no limitado a, Brij 58, Brij 35, así como otros tales como Triton X-100; Triton X-114, NP40, Span 85 y la serie Pluronic de tensioactivos no iónicos (por ejemplo, Pluronic 121) y un éster de ácido graso de sorbitano polioxietilenado, que incluye los polisorbatos. En algunas realizaciones, el tensioactivo es Polisorbato 80 (Tween 80), Polisorbato 60 (Tween 60), Polisorbato 40 (Tween 40) o Polisorbato 20 (Tween 20). En algunas realizaciones, el polisorbato 80 (Tween 80) está al 0,20 % ± el 0,042 % (p/p).

En algunas realizaciones, especialmente aquellas en las que la composición liofilizada no contiene un adyuvante, diluyente acuoso comprende un adyuvante. En algunas realizaciones, el adyuvante es ISCOMATRIX™.

En algunas realizaciones, especialmente aquellas en las que la composición liofilizada no contiene un tensioactivo, el diluyente comprende un tensioactivo, tal como, por ejemplo, polisorbato 80.

En algunas realizaciones, la composición inmunogénica líquida comprende un polipéptido rClfA intacto, como se describe en el presente documento, que está en una concentración de entre 20 µg/ml ± 2 µg/ml y 800 µg/ml ± 80 µg/ml, incluyendo por ejemplo 20 µg/ml ± 2 µg/ml, 40 µg/ml ± 4 µg/ml, 200 µg/ml ± 20 µg/ml, 400 µg/ml ± 40 µg/ml, 600 µg/ml ± 60 µg/ml y 800 µg/ml ± 80 µg/ml. En algunas realizaciones, la composición inmunogénica líquida comprende un polipéptido ClfA intacto que está a una concentración de entre 40 µg/ml ± 4 µg/ml y 800 µg/ml ± 80 µg/ml. En algunas realizaciones, la composición inmunogénica líquida comprende (a) un polipéptido rClfA intacto, como se describe en el presente documento, que está a una concentración de entre 20 µg/ml ± 2 µg/ml y 800 µg/ml ± ± 80 µg/ml, incluyendo por ejemplo 20 µg/ml ± 2 µg/ml, 40 µg/ml ± 4 µg/ml, 200 µg/ml ± 20 µg/ml, 400 µg/ml ± 40 µg/ml, 600 µg/ml ± 60 µg/ml y 800 ng/ml ± 80 µg/ml, (b) un conjugado PC5-CRM_{197} a entre 10 µg/ml ± 1 mg/ml y 400 µg/ml ± 40 µg/ml, incluyendo, por ejemplo, 10 µg/ml ± 1 µg/ml, 20 µg/ml ± 2 µg/ml, 100 µg/ml ± 10 µg/ml, 200 µg/ml ± 20 µg/ml y 400 µg/ml ± 40 µg/ml (c) un conjugado PC8-CRM_{197} a entre 10 µg/ml ± 1 µg/ml y 400 µg/ml ± 40 µg/ml, incluyendo, por ejemplo, 10 µg/ml ± 1 µg/ml, 20 µg/ml ± 2 µg/ml, 100 µg/ml ± 10 µg/ml, 200 µg/ml ± 20 µg/ml y 400 µg/ml ± 40 µg/ml, (d) tampón de histidina a de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM y de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM, (e) polisorbato 80 a de aproximadamente el 0,05 % a aproximadamente el 0,5 %, de aproximadamente el 0,075 % a aproximadamente el 0,25 % y de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 0,2 % en peso a volumen (p/v); y (f) de sacarosa a una concentración de aproximadamente el 0 % a aproximadamente el 25 % de sacarosa, de aproximadamente el 3 % a aproximadamente el 15 % y de aproximadamente el 5 a aproximadamente el 10 % p/v. En otras realizaciones, el polisorbato 80 está en una concentración del 0,01 % ± el 0,005 % peso a volumen (p/v) y la sacarosa está a una concentración del 4,5 % ± el 1,5 % p/v. En algunas realizaciones, la composición inmunogénica líquida comprende (a) un polipéptido rClfA intacto, como se describe en el presente documento, que está a una concentración de entre 20 µg/ml ± 2 µg/ml y 800 µg/ml ± ± 80 µg/ml, incluyendo por ejemplo 20 µg/ml ± 2 µg/ml, 40 µg/ml ± 4 µg/ml, 200 µg/ml ± 20 µg/ml, 400 µg/ml ± 40 µg/ml, 600 µg/ml ± 60 µg/ml y 800 ng/ml ± 80 µg/ml, (b) un conjugado PC5-CRM_{197} a entre 10 µg/ml ± 1 mg/ml y 400 µg/ml ± 40 µg/ml, incluyendo, por ejemplo, 10 µg/ml ± 1 µg/ml, 20 µg/ml ± 2 µg/ml, 100 µg/ml ± 10 µg/ml, 200 µg/ml ± 20 µg/ml y 400 µg/ml ± 40 µg/ml (c) un conjugado PC8-CRM_{197} a entre 10 µg/ml ± 1 µg/ml y 400 µg/ml ± 40 µg/ml, incluyendo, por ejemplo, 10 µg/ml ± 1 µg/ml, 20 µg/ml ± 2 µg/ml, 100 µg/ml ± 10 µg/ml, 200 µg/ml ± 20 µg/ml y 400 µg/ml ± 40 µg/ml, (d) tampón de histidina a de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM y de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM, (e) polisorbato 80 a de aproximadamente el 0,05 % a aproximadamente el 0,5 %, de aproximadamente el 0,075 % a aproximadamente el 0,25 % y de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 0,2 % en peso a volumen (p/v); y (f) de sacarosa a una concentración de aproximadamente el 0 % a

aproximadamente el 25 % de sacarosa, de aproximadamente el 3 % a aproximadamente el 15 % y de aproximadamente el 5 a aproximadamente el 10 % p/v. En otra realización, el polisorbato 80 está a una concentración del 0,01 % ± el 0,005 % peso a volumen (p/v) y la sacarosa está a una concentración del 4,5 % ± el 1,5 % p/v.

En algunas realizaciones, especialmente en casos en los que ni la composición liofilizada ni el diluyente contienen un adyuvante, el líquido inmunogénico se combina con un adyuvante.

En una realización, la divulgación proporciona un procedimiento de fabricación de una composición inmunogénica que comprende las etapas de: (a) combinar, en un medio acuoso, (i) un polipéptido factor aglutinante A ("rClfA"), (ii) un tampón que tiene un pKa de aproximadamente 6,0 ± 0,6 y (iii) un agente de carga; y (b) liofilizar la combinación de la etapa (a) para formar una torta, que contiene menos del 3 % de agua en peso. En una realización, la divulgación proporciona un procedimiento de fabricación de una composición inmunogénica que comprende las etapas de: (a) combinar, en un medio acuoso, (i) un polipéptido factor aglutinante A ("rClfA"), (ii) un conjugado PC5-CRM_{197}, (iii) un conjugado PC8-CRM_{197}, (iv) un tampón que tiene un pKa de 6,0 ± 0,6 y (v) un agente de carga; y (b) liofilizar la combinación de la etapa (a) para formar una torta que comprende menos del 3 por ciento de agua en peso. En una realización, la divulgación proporciona un procedimiento de fabricación de una composición inmunogénica que comprende las etapas de: (a) combinar una solución acuosa que comprende (i) un polipéptido factor aglutinante A ("rClfA"), (ii) un conjugado PC5-CRM_{197}, (iii) un conjugado PC8-CRM_{197}, (iv) un polipéptido MntC aislado, (v) un tampón que tiene un pKa de 6,0 ± 0,6 y (vi) un agente de carga; y (b) liofilizar la combinación de la etapa (a) para formar una torta que comprende menos del 3 por ciento de agua en peso. Las composiciones inmunogénicas de la invención son útiles en la prevención o el tratamiento de una infección por *Staphylococcus aureus*. En algunas realizaciones, la torta es de color blanco y tiene una textura esponjosa.

Por "liofilización", lo que se entiende es un procedimiento para el secado por congelación (criodesecación) de material. En general, el procedimiento de liofilización consiste en congelar un material, después, reducir la presión circundante y proporcionar el calor suficiente para permitir que el agua congelada del material se sublime. En algunos casos, la liofilización incluye una etapa inicial de congelación, una etapa de secado primario (sublimación), un secado secundario destinado a retirar las trazas finales de agua que permanezcan. En algunos casos, se incluye una etapa de recocido para mejorar las características de la torta y para mejorar la sublimación. Véase *Lyophilization of Biopharmaceuticals*, Henry y Michael Costatino Pikal, eds., AAPS Press, Arlington VA, 2004 para un análisis más detallado de la liofilización.

Por "torta", lo que generalmente se quiere decir es el material seco que queda después del procedimiento de liofilización. El aspecto de la torta depende de la estructura de la matriz sólida formada por congelación y está influenciada por diversos parámetros durante el procedimiento de liofilización. La adición de una etapa de recocido al procedimiento de liofilización con frecuencia puede dar como resultado un aspecto de la torta más uniforme.

En algunas realizaciones, un tensioactivo, tal como, por ejemplo, polisorbato 80, se combina con la rClfA, tampón y agente de carga en la etapa (a). En algunas realizaciones, el tensioactivo tiene una concentración de aproximadamente el 0,1 % ± el 0,05 % (p/v). En otras realizaciones, el tensioactivo tiene a una concentración del 0,01 % ± el 0,005 % p/v.

En algunas realizaciones, la combinación acuosa que se forma en la etapa (a) contiene un polipéptido rClfA intacto a una concentración de entre 20 µg/ml ± 2 µg/ml y 800 µg/ml ± 80 µg/ml, incluyendo, por ejemplo 20 µg/ml ± 2 µg/ml, 40 µg/ml ± 4 µg/ml, 200 µg/ml ± 20 µg/ml, 400 µg/ml ± 40 µg/ml, 600 µg/ml ± 60 µg/ml y 800 µg/ml ± 80 µg/ml. En algunas realizaciones, la combinación acuosa que se forma en la etapa (a) contiene un polipéptido rClfA intacto a una concentración de entre 20 µg/ml ± 2 µg/ml y 800 µg/ml ± 80 µg/ml, incluyendo, por ejemplo 20 µg/ml ± 2 µg/ml, 40 µg/ml ± 4 µg/ml, 200 µg/ml ± 20 µg/ml, 400 µg/ml ± 40 µg/ml, 600 µg/ml ± 60 µg/ml y 800 µg/ml ± 80 µg/ml, un conjugado PC5-CRM_{197} a entre 10 µg/ml ± 1 µg/ml y 400 µg/ml ± 40 µg/ml, incluyendo, por ejemplo, 10 µg/ml ± 1 µg/ml, 20 µg/ml ± 2 µg/ml, 100 µg/ml ± 10 µg/ml, 200 µg/ml ± 20 µg/ml y 400 µg/ml ± 40 µg/ml, un conjugado PC8-CRM_{197} a entre 10 µg/ml ± 1 µg/ml y 400 µg/ml ± 40 µg/ml, incluyendo, por ejemplo, 10 µg/ml ± 1 µg/ml, 20 µg/ml ± 2 µg/ml, 100 µg/ml ± 10 µg/ml, 200 µg/ml ± 20 µg/ml y 400 µg/ml ± 40 µg/ml, tampón de histidina a 10 mM ± 5 mM, polisorbato 80 al 0,1 % ± el 0,05 % en peso a volumen (p/v) y sacarosa a una concentración del 9 % ± el 4,5 % p/v. En otra realización, el polisorbato 80 está a una concentración del 0,01 % ± el 0,005 % p/v y la sacarosa está a una concentración del 4,5 % ± el 1,5 % p/v.

En algunas realizaciones, la combinación acuosa que se forma en la etapa (a) contiene un polipéptido rClfA intacto a una concentración de entre 40 µg/ml ± 4 µg/ml y 800 µg/ml ± 80 µg/ml, incluyendo por ejemplo, 40 µg/ml ± 4 µg/ml, 200 µg/ml ± 20 µg/ml, 600 µg/ml ± 60 µg/ml y 800 ng/ml ± 80 µg/ml, un conjugado PC5-CRM_{197} a entre 10 µg/ml ± 1 µg/ml y 400 µg/ml ± 40 µg/ml, incluyendo, por ejemplo, 10 µg/ml ± 1 µg/ml, 20 µg/ml ± 2 µg/ml, 100 µg/ml ± 10 µg/ml, 200 µg/ml ± 20 µg/ml y 400 µg/ml ± 40 µg/ml, un conjugado PC8-CRM_{197} a entre 10 µg/ml ± 1 µg/ml y 400 µg/ml ± 40 µg/ml, incluyendo, por ejemplo, 10 µg/ml ± 1 µg/ml, 20 µg/ml ± 2 µg/ml, 100 µg/ml ± 10 µg/ml, 200 µg/ml ± 20 µg/ml y 400 µg/ml ± 40 µg/ml, un polipéptido MntC a entre 40 µg/ml ± 4 µg/ml y 800 µg/ml ± 80 µg/ml, incluyendo por ejemplo, 40 µg/ml ± 4 µg/ml, 200 µg/ml ± 20 µg/ml, 600 µg/ml ± 60 µg/ml y 800 ng/ml ± 80 µg/ml, tampón de histidina a 10 mM ± 5 mM, polisorbato 80 al 0,1 % ± el 0,05 % en peso a volumen (p/v) y sacarosa a una concentración del 9 % ± el 4,5 % p/v. En otra realización, el polisorbato 80 está a una concentración del 0,01 % ± el

0,005 % en peso a volumen (p/v) y la sacarosa está a una concentración del 4,5 % ± el 1,5 % p/v.

En algunas realizaciones, la etapa de liofilización comprende las etapas de (i) congelar la combinación acuosa, (ii) recocer la combinación acuosa y (iii) secar la combinación en dos fases. En una realización, (i) la congelación se realiza mediante la reducción de la temperatura de la combinación acuosa en etapas de 0,3 ºC ± 0,03 ºC por minuto hasta que se alcanza una temperatura de -50 ºC ± 5 ºC a una presión de 400 mbar (40 kPa) ± 40 mbar (4 kPa), después, se mantiene durante 60 minutos ± 6 minutos; (ii) el recocido se realiza mediante el aumento de la temperatura a -105 ºC ± 5 ºC a una velocidad de 0,3 ºC ± 0,03 ºC por minuto, seguido del mantenimiento de la temperatura a -105 ºC ± 5 ºC durante 120 minutos ± 12 minutos, seguido de la disminución de la temperatura a una velocidad de 0,3 ºC ± 0,03 ºC por minuto hasta alcanzar una temperatura de -50 ºC ± 5 ºC y manteniendo la temperatura a -50ºC ± 5 ºC durante 180 minutos ± 18 minutos; (iii) la primera fase de secado se realiza por la disminución de la presión a 50 mTorr (6,65 Pa) y manteniendo durante 30 minutos ± 3 minutos, seguido del aumento de la temperatura a -30 ºC ± 5 ºC a una velocidad de 0,2 ºC ± 0,02 ºC por minuto y manteniendo a esa temperatura durante 1.920 minutos ± 192 minutos; y (iv) la segunda fase de secado se realiza mediante el aumento de la temperatura a 30 ºC ± 5 ºC a una velocidad de 0,2 ºC ± 0,02 ºC por minuto, seguido del aumento de la presión a 200 mTorr (26,60 Pa) y manteniendo la temperatura a 30C ± 5 ºC durante 720 minutos ± 72 minutos. En ciertas realizaciones, la congelación se realiza a aproximadamente 1013 mbar (1 atm). En ciertas realizaciones, la congelación se realiza a velocidades de hasta 1013 mbar (1 atm). En ciertas realizaciones, el tiempo de secado puede ser de aproximadamente 2,600 minutos. En ciertas realizaciones, el tiempo de secado puede ser de hasta 2.600 minutos. En ciertas realizaciones, la temperatura de secado es 40C ± 5 ºC, 50 ºC ± 5 ºC o 60 ºC ± 5 ºC. Después de la etapa final de secado, la temperatura de la composición liofilizada se reduce a 5 ºC ± 5 ºC a una velocidad de 0,5 ºC ± 0,05 ºC por minuto. En ciertas realizaciones, la liofilización se realiza en un vial. En algunas realizaciones, el vial se tapa después de la liofilización. En algunas realizaciones, el vial se rellena con nitrógeno antes de taparse y se tapa a un vacío parcial, tal como una presión atmosférica del 60 %.

En una realización, el procedimiento también comprende la etapa de reconstituir la composición liofilizada en un diluyente acuoso, en el que la osmolalidad de la combinación reconstituida es 300 mOsm ± 30 mOsm. En algunas realizaciones, el diluyente acuoso es agua. En algunas realizaciones, el diluyente acuoso es NaCl 60 mM.

En una realización, la solicitud proporciona una composición inmunogénica fabricada de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente.

En ciertas realizaciones, una formulación de la invención comprende uno o más agentes estabilizantes adecuados para la administración parenteral, por ejemplo, un agente reductor que comprende al menos un grupo tiol (-SH) (por ejemplo, cisteína, N-acetilcisteína, glutatión reducido, tioglicolato de sodio, tiosulfato, monotioglicerol o mezclas de los mismos). Como alternativa u opcionalmente, las formulaciones de composición inmunogénica de la invención que contienen conservantes pueden estabilizarse adicionalmente mediante la retirada del oxígeno de los recipientes de almacenamiento, protegiendo la formulación de la luz (por ejemplo, mediante el uso de envases de vidrio de color topacio).

Las formulaciones de composición inmunogénica de la invención que contienen conservantes pueden comprender uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables, lo que incluye cualquier excipiente que no induzca por sí mismo una respuesta inmunitaria. Los excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a las macromoléculas tales como proteínas, sacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, sacarosa (Paoletti y col., 2001, *Vaccine*, 19:2118), trehalosa, lactosa y agregados lipídicos (tales como gotitas de aceite o liposomas). Dichos vehículos son bien conocidos para el experto en la materia. Se analizan excipientes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, en Gennaro, 2000, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20ª edición, ISBN: 0683306472.

En una realización, la invención proporciona una composición inmunogénica líquida fabricada por reconstitución de una composición inmunogénica liofilizada, como en el presente documento se describe, en un diluyente acuoso. En algunas realizaciones, el diluyente acuoso es agua. En otras realizaciones, el diluyente acuoso es una solución baja en sal. Lo que se entiende por una solución baja en sal es una solución acuosa con una concentración de sal de entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 200 mM, preferentemente entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 100 mM. En algunas realizaciones, la sal es cloruro de sodio. En algunas realizaciones, la solución baja en sal comprende cloruro de sodio a 60 mM ± 6 mM. En algunas realizaciones, la composición inmunogénica líquida tiene un pH de 6,0 ± 0,6.

Mediante el uso del término "diluyente", lo que se entiende es un líquido capaz de suspender, diluir o solubilizar cualquier sustancia. En algunas realizaciones, la sustancia es una composición liofilizada que contiene un polipéptido ClfA. En algunas realizaciones, el diluyente es acuoso y solubiliza la composición liofilizada.

La administración directa de las composiciones inmunogénicas liofilizadas reconstituidas de la presente invención a un sujeto puede realizarse mediante la administración parenteral (intramuscular, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, intravenosa o al espacio intersticial de un tejido); o administración rectal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intranasal, ocular, aural, pulmonar u otra administración en la mucosa. En una realización preferida, la administración parenteral es por inyección intramuscular, por ejemplo, en el muslo o parte superior del brazo. La

inyección puede ser a través de una aguja (por ejemplo, una aguja hipodérmica), pero como alternativa puede utilizarse una inyección sin aguja. Una dosis intramuscular típica es de 0,5 ml. Las composiciones de la invención pueden prepararse en diversas formas, por ejemplo, para la inyección ya sea como soluciones o suspensiones líquidas.

Pueden determinarse cantidades óptimas de componentes para una composición inmunogénica particular mediante estudios convencionales que implican la observación de respuestas inmunes apropiadas en sujetos. Tras una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo adecuadamente espaciadas.

Embalaje y formas de dosificación

Las composiciones inmunogénicas de la divulgación pueden empaquetarse en forma de dosis unitaria o en dosis múltiples (por Ejemplo, 2 dosis, 4 dosis o más). En ciertas realizaciones, la dosis es una dosis de 0,5 ml después de la reconstitución de una composición inmunogénica liofilizada. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente internacional W02007/127668.

Las composiciones pueden presentarse en viales u otros recipientes de almacenamiento adecuados, o pueden presentarse en dispositivos de entrega precargados, por ejemplo, jeringuillas de componentes individuales o múltiples, que pueden suministrarse con o sin agujas. Una jeringuilla normalmente, pero no necesariamente, contiene una dosis única de la composición inmunogénica de la invención que contiene conservante, a pesar de que también se prevén jeringuillas precargadas de múltiples dosis. Análogamente, un vial puede incluir una sola dosis, pero puede incluir, como alternativa, múltiples dosis.

Pueden establecerse volúmenes de dosificación eficaces de forma rutinaria, pero una dosis típica de una composición liofilizada reconstituida para inyección tiene un volumen de 0,5 ml. En ciertas realizaciones, la dosis se formula para su administración a un sujeto humano. En ciertas realizaciones, la dosis se formula para su administración a un sujeto humano adulto, joven, adolescente, niño en edad de empezar a caminar o lactante (es decir, no más de un año de edad) y puede, en realizaciones preferidas, administrarse por inyección.

Las composiciones inmunogénicas de la presente divulgación pueden liofilizarse y reconstituirse, por ejemplo, utilizando uno de una multitud de procedimientos para el secado por congelación bien conocidos en la técnica para formar partículas secas, de forma regular (por ejemplo, esféricas), separadas, tales como microgránulos o microesferas, que tengan características de partícula tales como tamaños de diámetro que pueden seleccionarse y controlarse por la variación de los procedimientos exactos utilizados para prepararlas. Las composiciones inmunogénicas pueden comprender adicionalmente un adyuvante que puede estar opcionalmente preparado con, o contenido en, partículas secas, de forma regular (por ejemplo, esféricas), separadas, tales como microgránulos o microesferas. En una realización, la presente divulgación proporciona además un kit de composición inmunogénica que comprende un primer componente que incluye una composición inmunogénica liofilizada, que comprende opcionalmente, adicionalmente, uno o más conservantes de la invención y un segundo componente que comprende una solución acuosa, estéril, para la reconstitución del primer componente. En ciertas realizaciones, la solución acuosa comprende uno o más conservantes y puede comprender opcionalmente al menos un adyuvante (véase, por ejemplo, el documento W02009/109550).

En otra realización más, un recipiente del formato de múltiples dosis se selecciona entre uno o más del grupo que consiste en, pero no se limita a, material de vidrio de laboratorio general, matraces, vasos de precipitados, probetas graduadas, fermentadores, biorreactores, tubos, tuberías, bolsas, tarros, viales, cierres de viales (por ejemplo, un tapón de goma, una tapa a rosca), ampollas, jeringuillas, jeringuillas de doble o múltiples cámaras, tapones de jeringuillas, émbolos de jeringuilla, cierres de goma, cierres de plástico, cierres de vidrio, cartuchos y plumas desechables y similares. El recipiente de la presente invención no está limitado por el material de fabricación, e incluye materiales tales como vidrio, metales (por ejemplo, acero, acero inoxidable, aluminio, etc.) y polímeros (por ejemplo, termoplásticos, elastómeros, elastómeros termoplásticos). En una realización particular, el recipiente del formato es un vial de vidrio Schott de Tipo 1 de 5 ml con un tapón de butilo. El experto en la materia apreciará que el formato expuesto anteriormente no es, de ninguna manera, una lista exhaustiva, sino que simplemente sirve como directriz al técnico con respecto a la diversidad de formatos disponible para la presente invención. Pueden encontrarse formatos adicionales contemplados para su uso en la presente invención en los catálogos publicados de proveedores y fabricantes de equipos de laboratorio tales como United States Plastic Corp. (Lima, OH), VWR.

Evaluación de composiciones inmunogénicas

En una realización, la presente divulgación proporciona composiciones inmunogénicas que comprenden al menos un antígeno de un organismo *S. aureus.* En una realización, la presente divulgación proporciona composiciones inmunogénicas que comprenden al menos tres antígenos de un organismo *S. aureus.* La presente invención proporciona composiciones inmunogénicas que comprenden al menos cuatro antígenos de un organismo con *S. aureus*.

Pueden utilizarse diversos ensayos *in vitro* para evaluar la inmunogenicidad de las composiciones inmunogénicas de la invención. Por ejemplo, puede realizarse un ensayo de opsonización *in vitro* mediante la incubación de una mezcla de células estafilocócicas, suero inactivado por calor que contiene anticuerpos específicos para los

antígenos en cuestión y una fuente exógena de complemento. La opsonofagocitosis transcurre durante la incubación de las células polimorfonucleares (PMN) recién aisladas o células efectoras diferenciadas tales como HL60s y la mezcla de células de anticuerpo/complemento/estafilocócicas. Las células bacterianas que están recubiertas con anticuerpo y complemento se destruyen tras la opsonofagocitosis. Pueden determinarse las unidades formadoras de colonias (ufc) de bacterias supervivientes que se recuperan de la opsonofagocitosis mediante la siembra en placa de la mezcla de ensayo. Los títulos se expresan como el recíproco de la mayor dilución que proporciona el 50 % de destrucción bacteriana, como se determina mediante comparación con controles de ensayo.

También puede utilizarse un ensayo de ELISA de células enteras para evaluar la inmunogenicidad *in vitro* y la exposición superficial del antígeno, en el que la cepa bacteriana de interés (*S. aureus*) se aplica como recubrimiento en una placa, tal como una placa de 96 pocillos, y se hacen reaccionar sueros de ensayo de un animal inmunizado con células bacterianas. Si cualquier anticuerpo, específico para el antígeno de ensayo, es reactivo con un epítopo expuesto en la superficie del antígeno, puede detectarse mediante procedimientos convencionales conocidos para un experto en la materia.

Después, cualquier antígeno que muestre la actividad *in vitro* deseada puede someterse a ensayo en un modelo de exposición de los animales *in vivo.* En ciertas realizaciones, las composiciones inmunogénicas pueden utilizarse en la inmunización de un animal (por ejemplo, un ratón) mediante procedimientos y vías de inmunización conocido por los expertos en la materia (por ejemplo, intranasal, parenteral, oral, rectal, vaginal, transdérmica, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, etc.). Después de la inmunización del animal con una composición inmunogénica de *Staphylococcus sp.* particular, el animal se expone un *Staphylococcus sp.* y se somete a ensayo la resistencia a la infección por estafilococos.

En una realización, los ratones libres de patógenos pueden inmunizarse y exponerse a *S. aureus.* Por ejemplo, los ratones se inmunizan con una o más dosis del antígeno deseado en una composición inmunogénica. Posteriormente, los ratones se exponen a S. *autreus* y la supervivencia se controla durante el tiempo posterior a la exposición.

Procedimientos de inmunización

También se proporcionan procedimientos de inmunización de un hospedador para prevenir la infección estafilocócica. En una realización preferida, el hospedador es humano. Por tanto, a un hospedador o sujeto se le administra una cantidad inmunogénica de una composición inmunogénica como se describe en el presente documento. Una cantidad inmunogénica de una composición inmunogénica puede determinarse haciendo un estudio de dosis-respuesta en el que los sujetos se inmunizan con cantidades gradualmente crecientes de la composición inmunogénica y la respuesta inmunitaria se analiza para determinar la dosis óptima. Los puntos de partida para el estudio pueden deducirse de los datos de inmunización en modelos animales. La cantidad de dosificación puede variar dependiendo de las condiciones específicas del individuo. La cantidad puede determinarse en ensayos habituales por medios conocidos por los expertos en la materia. En algunas realizaciones, el procedimiento de inmunización de un hospedador para prevenir la infección, enfermedad o afección estafilocócica comprende un tratamiento humano, veterinario, animal o agrícola. Otra realización proporciona un procedimiento de inmunización de un hospedador para prevenir la infección, enfermedad o afección estafilocócica asociada a un *Staphylococcus sp.* en un sujeto, comprendiendo el procedimiento la generación de una preparación de anticuerpos policlonales o monoclonales a partir de la composición inmunogénica descrita en el presente documento, y el uso de dicha preparación de anticuerpos para conferir inmunidad pasiva al sujeto.

Se administra una cantidad inmunológicamente eficaz de la composición inmunogénica en un número apropiado de dosis al sujeto para inducir una respuesta inmunitaria. El individuo tratado no debería presentar las manifestaciones clínicas más graves de la infección estafilocócica. La cantidad de dosificación puede variar dependiendo de las condiciones específicas del individuo, tales como la edad y el peso. Esta cantidad puede determinarse en ensayos habituales por medios conocidos por los expertos en la materia.

En una realización, pacientes a los que se les administraron composiciones inmunogénicas de la invención mostraron una reducción en las tasas de estado de portador de *S. aureus*. Dicha reducción en el estado de portador o en un intervalo de tiempo prolongado pasado como no portador tras la administración de una composición inmunogénica es importante desde una perspectiva de necesidad médica. Por ejemplo, la reducción del estado de portador global de *S. aureus* en los portadores puede evaluarse después de una dosis de vacuna de múltiples antígenos de *S. aureus*. Por ejemplo, 1 día antes de la administración de una composición inmunogénica, puede explorarse un grupo de adultos de 18-50 años para determinar el estado de portador mediante hisopados nasales y de la garganta, seguidos de cultivo para determinar su estado de portador. Después, puede administrarse al grupo una composición inmunogénica de la invención recibiendo un grupo un control. Se realizan hisopados nasales y de la garganta semanalmente durante un período de 12 semanas y mensualmente hasta 6 meses después de la administración de la composición inmunogénica y se comparan con el placebo. Un criterio de valoración principal es comparar las tasas de estado de portador en los pacientes después de la administración de una composición inmunogénica frente a placebo en intervalos de 3 meses después de la inmunización.

Modelos animales de infección estafilocócica

Se describen a continuación varios modelos animales para su uso en la evaluación de la eficacia de cualquiera de las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento.

Modelo de sepsis murina (pasiva o activa)

Modelo de inmunización pasiva

Se inmunizaron ratones pasivamente por vía intraperitoneal (i.p.) con IgG inmunitaria o anticuerpo monoclonal. Los ratones se expusieron posteriormente 24 horas más tarde con una dosis letal de *S. aureus.* Las bacterias de la exposición se administraron por vía intravenosa (i.v.) o i.p. garantizando que cualquier supervivencia pudiera atribuirse a la interacción *in vivo* específica del anticuerpo con las bacterias. Se determinó la dosis de exposición bacteriana para que fuera la dosis necesaria para conseguir la sepsis letal de aproximadamente el 20 % de los ratones de control no inmunizados. La evaluación estadística de los estudios de supervivencia puede realizarse mediante análisis de Kaplan-Meier.

Modelo de inmunización activa

En este modelo, se inmunizaron ratones (por ejemplo, ratones Swiss Webster) activamente por vía intraperitoneal (i.p.) o subcutánea (s.c.) con un antígeno diana a 0, 3 y 6 semanas (u otro esquema de vacunación debidamente espaciado similar) y posteriormente se expusieron a *S. aureus* en la semana 8 por vía intravenosa. La dosis de exposición bacteriana se calibró para conseguir una supervivencia de aproximadamente el 20 % en el grupo control durante un período de 10-14 días. La evaluación estadística de los estudios de supervivencia puede realizarse mediante análisis de Kaplan-Meier.

Modelo de endocarditis infecciosa (pasiva o activa)

Se ha utilizado anteriormente un modelo de inmunización pasiva para la endocarditis infecciosa (EI) provocada por *S. aureus* para demostrar que ClfA puede inducir inmunidad protectora. Véase Vernachio y col., *Antmicro. Agents & Chemo.* 50:511-518 (2006). En este modelo de EI, se utilizaron conejos o ratas para simular infecciones clínicas que incluían un catéter venoso central, bacteriemia y diseminación hematógena a órganos distales. A conejos o ratas cateterizados con vegetaciones de la válvula aórtica estériles se les administró una única o múltiples inyecciones intravenosas de un anticuerpo monoclonal o policlonal específico para el antígeno diana. Posteriormente, los animales se expusieron por vía i.v. a una cepa de *S. aureus* o S. *epidermidis*. A continuación, después de la exposición, se recogieron corazón, vegetaciones cardíacas y otros tejidos, incluyendo riñones y sangre y se cultivaron. Después, se midió la frecuencia de infección estafilocócica en el tejido cardíaco, los riñones y la sangre. En un estudio, cuando los animales se expusieron a ya fuera SERM ATCC 35984 o SARM 67-0, se demostraron reducciones significativas en la tasa de infección utilizando ya fuera la preparación de anticuerpo policlonal o el anticuerpo monoclonal para ClfA. Véase Vernachio y col., *Antmicro. Agents & Chemo*. 50:511-518 (2006).

El modelo de la endocarditis infecciosa también se ha adaptado para estudios de inmunización activa, tanto en conejos como en ratas. Los conejos o ratas se inmunizaron por vía intramuscular o por vía subcutánea con antígeno diana y se expusieron a *S. aureus* dos semanas más tarde a través de la vía intravenosa.

Modelo de pielonefritis

En el modelo de pielonefritis, se inmunizaron ratones en 0, 3 y 6 semanas (u otro esquema de vacunación debidamente espaciado similar) con los antígenos diana. Posteriormente, los animales se exponen por vía i.p. o i.v. con *S. aureus* PFESA0266. Después de 48 horas, los riñones se recogieron y se enumeraron las UFC de bacterias.

Anticuerpos y composiciones de anticuerpos

La divulgación proporciona además anticuerpos y composiciones de anticuerpos que se unen específica y selectivamente a uno o más antígenos de una composición inmunogénica de la presente divulgación. En algunas realizaciones, los anticuerpos se generan tras la administración a un sujeto de una composición inmunogénica de la presente divulgación. En algunas realizaciones, la divulgación proporciona anticuerpos purificados o aislados contra uno o más de los antígenos de una composición inmunogénica de la presente divulgación. En algunas realziaciones, los anticuerpos de la presente divulgación son funcionales según se mide matando bacterias en un modelo de efectividad animal o bien a través de un ensayo de muerte opsonofagocítica. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la divulgación confieren inmunidad pasiva a un sujeto. La presente divulgación proporciona además moléculas de polinucleótido que codifican un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de la divulgación, y una célula o línea celular (tales como células de hibridoma u otras líneas celulares diseñadas por ingeniería para la producción recombinante de anticuerpos) y un animal transgénico que produce un anitcuerpo o una composición de anticuerpo de la divulgación, usando técnicas bien conocdias por aquellos expertos en la materia.

Los anticuerpos o las composiciones de anticuerpo de la divulgación pueden usarse en un procedimiento de tratamiento o de prevención de infección, enfermedad o afección estafilocócicas asociadas a un *Staphylococcus sp.* en un sujeto, comprendiendo el procedimiento generar una preparación de anticuerpo policlonal o monoclonal y usando dicho anticuerpo o composición de anticuerpo para conferir inmunidad pasiva al sujeto. Los anticuerpos de la

invención pueden ser útiles también para procedimientos diagnósticos, por ejemplo, detectar la presencia de o cuantificar los niveles de uno o más antígenos de las composiciones inmunogénicas de la presente divulgación.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos muestran algunas realizaciones de la presente invención. Ha de apreciarse que cuando se han proporcionado condiciones de reacción típicas (por ejemplo, temperatura, tiempos de reacción, etc.), las condiciones por encima y por debajo de los intervalos especificados también pueden utilizarse, aunque en general menos convenientemente. Todas las partes y porcentajes mencionados en el presente documento son en peso y todas temperaturas se expresan en grados centígrados a menos que se especifique lo contrario.

Además, los siguientes ejemplos se realizaron utilizando técnicas convencionales, que son bien conocidas y habituales para los expertos en la materia, excepto donde se describa lo contrario en detalle.

Se describe una formulación liofilizada estable, de tri-antígeno que comprende Factor aglutinante A (rClfA) recombinante, conjugado de polisacárido capsular de tipo 5 (PC5-CRM_{197}) y conjugado de polisacárido capsular de tipo 8 (PC8-CRM_{197}), que se ha desarrollado como una vacuna o composición inmunogénica de *Staphylococcus aureus*. En una realización particular, la rClfA es una forma mutada de un factor de virulencia expresado en la superficie por ingeniería genética para disminuir su afinidad de unión a fibrinógeno (Y388A) (rClfAm). PC5 y PC8 son polisacáridos comunes que se encuentran en los aislados clínicos y, en esta vacuna, se conjugan con una proteína transportadora CRM197.

Las tortas que se fabricaron eran visualmente adecuadas y los componentes activos se mantuvieron estables tras la reconstitución de las tortas. Además, el almacenamiento de un mes de múltiples lotes (abarcando dosis altas y bajas) de la formulación liofilizada en tiempo real (2-8 ºC) y temperaturas aceleradas (25 ºC 37 ºC y) demostró que la formulación liofilizada de tri-antígeno se mantuvo estable. Además, tres ciclos de congelación-descongelación y un ensayo de estabilidad de 24 horas se realizaron a temperatura ambiente después de la reconstitución mostraron cada uno una estabilidad de los ingredientes activos en esas condiciones.

También se desvela una formulación de tetra-antígeno liofilizada estable, que comprende C1fA recombinante, PC5-CRM_{197}, PC8-CRM_{197} y MntC, que se ha desarrollado como una vacuna o composición inmunogénica de *Staphylococcus aureus*. En una realización particular, ClfA es una forma mutada de un factor de virulencia expresado en la superficie diseñado para disminuir su afinidad de unión a fibrinógeno (Y388A). En una realización particular, MntC no está lipidada. En una realización particular, MntC es recombinante. Al igual que con la formulación de tri-antígeno, la formulación de tetra-antígeno liofilizada aumentó en gran medida la estabilidad en comparación con las formulaciones líquidas que comprenden los mismos antígenos.

Ejemplo 1: metodología de preformulación

Se utilizó una diversidad de herramientas biofísicas (espectroscopia de absorción UV derivada, espectroscopia de fluorescencia, dicroísmo circular (DC) y calorimetría diferencial de barrido (CDB) para examinar las características intrínsecas de la proteína factor aglutinante A (ClfA) de *Staphylococcus aureus* en el contexto de la estabilidad estructural. La temperatura y el pH fueron los parámetros variables utilizados para ejercer tensión sobre la proteína para ayudar a caracterizar el comportamiento estructural intrínseco de la proteína ClfA. Después, estos datos se utilizaron para la selección de excipientes que pudieran proporcionar estabilidad adicional a la proteína. Además, se realizaron estudios de unión para evaluar la afinidad dependiente de la dosis y del pH de ClfA por $AlPO_4$ y $Al(OH)_3$. Los datos desvelados en el presente documento se utilizaron para llegar a una formulación para ClfA para su uso en aplicaciones biomédicas, tales como, por ejemplo, una vacuna o composición inmunogénica.

Si bien la invención se refiere a cualquier y todas las proteínas de factor aglutinante A (ClfA) y a formulaciones que contienen C1fA, los siguientes ejemplos utilizaron una ClfA variante, que comprende los dominios N1N2N3 de ClfA y tiene una sustitución Y338A, que comprende una tirosina sustituida por alanina correspondiente a la posición 338 de una ClfA de longitud completa y que carece de la capacidad para unirse a fibrinógeno.

Las muestras preparadas para las caracterizaciones biofísicas iniciales estaban compuestas de tampón 10 mM (acetato, succinato o fosfato) en NaCl 150 mM. Las concentraciones diana aproximadas de la ClfA eran 0,1 mg/ml para la fluorescencia, 0,2 mg/ml para el dicroísmo circular (DC) y 0,5 mg/ml para la espectroscopia de absorción UV.

Las concentraciones de proteína se determinaron utilizando un ensayo de proteínas disponible en el mercado Lowry Modificado (Pierce; Lowry y col. *J. Biol Chem*.; 193:265-275 [1951]) o espectroscopia de absorbancia de UV.

El dicroísmo circular (DC) se realizó con un espectropolarímetro Jasco J-810 para evaluar la estructura secundaria de la proteína ClfA en la composición inmunogénica o vacuna. El efecto del pH sobre la estructura de ClfA se examinó mediante la observación de diferencias cualitativas en los espectros de DC cuando la proteína se formuló a intervalos de pH de 5,0 a 8,0. Por otra parte, los experimentos de perturbación de temperatura se realizaron de 10 ºC a 85 ºC a 218 nm para observar la estabilidad conformacional de la proteína desde una perspectiva de la estructura secundaria. La longitud de onda de 218 nm se eligió debido a que la estructura N2N3 conocida de ClfA comprende grandes cantidades de estructura de lámina β. Los parámetros experimentales para las exploraciones

por DC incluyeron un intervalo de longitudes de onda de 190-260 nm, velocidad de exploración de 20 nm/min, tiempo de respuesta de dos segundos, ancho de banda 1 nm y una acumulación de tres (3). Los experimentos de perturbación de temperatura se realizaron con el modo de temperatura variable en el software Jasco, utilizando un desnivel de temperatura de 15 ºC/hora, una respuesta de un segundo y un ancho de banda de 1 nm.

Se utilizó la espectroscopia de emisión de fluorescencia intrínseca del triptófano para controlar los cambios en la estructura terciaria de la proteína ClfA en función de la temperatura. El procedimiento también se utilizó para observar los cambios en la estructura proteínica en tiempo real y durante los estudios acelerados. Los espectros de fluorescencia se registraron en un fluorímetro PTI QM-1 (Brunswick, NJ) con 295 nm de excitación. La concentración de proteína utilizada fue de ~0,1 mg/ml. Los espectros de emisión característicos del triptófano se controlaron entre 320~350 nm utilizando una cubeta de cuarzo de 1 cm de longitud de paso. Los datos de fluorescencia se obtuvieron a los 10 ºC-85 ºC (intervalos de 2,5 ºC) para una serie de valores de pH entre 4,0 y 8,0. Los experimentos de control se realizaron utilizando tampones como blancos para la corrección de fondo. Los ajustes instrumentales incluyeron un ancho de banda de excitación y emisión de 4 nm y 3 nm, respectivamente, un tiempo de integración de un segundo y un intervalo de longitud de onda de recolección de datos de 290 nm-400 nm. Para las formulaciones que contienen $AlPO_4$, se utilizó una cubeta de geometría frontofacial (triangular) para eludir las limitaciones de turbidez de la muestra. El análisis de los datos se realizó con Origin® 7.0 utilizando una función polinomial de segundo orden de 11 puntos de Savitsky-Golay para el alisamiento.

Se utilizaron experimentos de perturbación de la temperatura con espectroscopia de absorción UV de segunda derivada como otro procedimiento para examinar la estructura terciaria de ClfA para evaluar la estabilidad proteínica intrínseca. Se obtuvieron espectros de absorción UV-visible de múltiples longitudes de onda de 200 nm-400 nm con un espectrómetro de diodos en serie de UV-visible Agilent 8453 equipado con un controlador de temperatura Peltier. Se utilizó una cubeta de cuarzo con una longitud de paso de 1 cm con un volumen de 100 µl para todos los experimentos. Para los experimentos de fusión, se permitieron cuatro minutos después de cada cambio de temperatura, que se consideraron suficientes para alcanzar el equilibrio. También se recogieron datos de densidad óptica a 350 nm en función de la temperatura para controlar la agregación potencial de la proteína ClfA.

Se realizaron análisis de espectros con el software CHEMSTATION™ (Agilent). Los espectros de segunda derivada se obtuvieron utilizando un filtro de datos de nueve puntos y se ajustaron a un polinomio de Savitzky-Golay de tercer grado. Los espectros derivados se interpolaron con 99 puntos de datos entre cada intervalo de un nanómetro, proporcionando una resolución eficaz de aproximadamente 0,01 nm en condiciones de no agregación. Se utilizó MICROCAL ORIGIN™ 6.0 para seleccionar posiciones de los picos de los espectros derivados. Se identificaron posiciones de picos correspondientes a los restos de aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptófano (basándose en el procedimiento de Kueltzo y col., *J Pharm. Sci.* 2003; 92(9):1805-1820) y se representaron en función de la temperatura.

Se realizó una cromatografía de exclusión de tamaño utilizando una columna TOSOH TSK-GEL G3000SWxl, 7,8 mm x 30 cm, 5 µm, número de pieza 08541, utilizando las siguientes condiciones: caudal, 0,5 ml/min; presión máxima, 60 bar (6 MPa); tiempo de ejecución, 30 min; fase móvil, Cellgro PBS, pH 7,4; volumen de inyección, 100 µl; detector, UV 280, 260, 214 nm, ancho de banda de 4 nm para todas; referencia, 340 nm, ancho de banda de 16 nm; temperatura, 25 ºC.

La temperatura de fusión (T_m) de la proteína ClfA se determinó mediante calorimetría diferencial de barrido (CDB). El perfil de CDB de la muestra de ClfA se midió frente a un tampón emparejado preparado al mismo tiempo que la muestra de ClfA, excepto por que el volumen que se habría ocupado por la sustancia farmacológica (ClfA) fue reemplazado por tampón. Los ajustes del instrumento fueron los siguientes: tasa de exploración, 200 ºC/h; intervalo de exploración, 10-90 ºC; períodos de filtro, 8 segundos; modo de retroalimentación/ganancia, medio. Después de cada exploración, las cubetas y la jeringa de CDB se aclararon 3-5 veces con agua para inyección (API). En el caso de cualquier experimento de reexploración, el ciclo de limpieza de las cubetas incluye el uso de Contrad al 10 % (Decon Laboratories Ltd., East Sussex, Reino Unido) para asegurar una cubeta limpia para la siguiente ejecución.

Se utilizó CDB por microcalorimetría capilar como una plataforma de alto rendimiento para la detección de excipientes. En cada experimento de detección de excipientes, ClfA en tampón succinato 10 mM, NaCl 150 mM, pH 6,0 se usó como base para el cálculo de un cambio en la T_f. La T_f aparente se obtuvo para muestras de CDB por duplicado y la T_f promedio después se comparó con la T_f promedio de la formulación sin excipiente en la misma ejecución de CDB. El efecto de cada excipiente/concentración se comparó por el efecto del cambio en la T_f. Un cambio positivo en la T_f en presencia de un excipiente se consideró un efecto positivo sobre la estabilidad térmica de ClfA. Para el cálculo de ΔG, se calculó ΔC_p a partir de las líneas basales antes y después de la transición, seleccionadas manualmente, después se calcularon AH y T_f mediante la integración del área comprendida entre la curva y la línea basal. La curva de ΔG se calculó utilizando el software de CDB Microcal.

Ejemplo 2: preformulación de un medicamento de clfa: resultados

Se ejercieron esfuerzos farmacéuticamente relevantes de la temperatura (10-85 ºC) y pH (4,0-8,0) sobre el medicamento (ClfA formulada líquida) y la sustancia farmacológica (proteína ClfA no formulada en fase líquida) para identificar sus susceptibilidades.

Se realizaron estudios de fusión térmica de fluorescencia de triptófano intrínseca en muestras de ClfA a diversos pH de pH 4,0 a pH 8,0 y se generaron curvas de emisión de fluorescencia. Para estos experimentos, la ClfA estaba en general a una concentración de 0,1 mg/ml-0,2 mg/ml. Se identificó que los puntos de inflexión de cada curva eran la temperatura de fusión (T_f) y se tabularon en la Tabla 4. A 10 ºC, las muestras a los valores de pH más altos mostraron posiciones de los picos a longitudes de onda más altas, lo que señala que los restos de triptófano estaban más expuestos al disolvente. Además, a valores de pH más altos, ClfA presentó valores de T_f más bajos indicando una menor estabilidad en comparación con valores de pH inferiores, tales como pH 5,5 y 6,0. Un panel de pH en incrementos más pequeños de 0,2 (Tabla 5) del pH 5,5 a 6,5 demostró un aumento gradual en la T_f con una disminución del pH.

TABLA 4

pH	TAMPÓN	T_f
4	acetato	50,1
5	acetato	56,1
5,5	succinato	55,7
6	succinato	53,7
6,5	succinato	49,7
7	fosfato	48,2
8	fosfato	43,7

TABLA 5

pH	T_f (ºC)
5,5	55,7
5,8	53,9
6,0	53,2
6,3	50,4
6,5	49,7

Se empleó dicroísmo circular (DC) para examinar la estructura secundaria de ClfA en función del pH. Los espectros obtenidos a pH 7,0 y pH 8,0, en particular, mostraron mínimos bien definidos a -200 nm y 220 nm. Una interpretación probable de esta observación es que el mínimo a -220 nm podría deberse al componente lámina β de la estructura N2N3 conocida, y que el mínimo a -200 nm se aproxima al mínimo de enrollamiento aleatorio que se ve por lo general a aproximadamente 195 nm. Estas observaciones apoyan los datos de fluorescencia de que la proteína ClfA está ligeramente más desplegada a pH 7,0 y pH 8,0.

Se realizaron puntos de fusión por CD de ClfA de pH 4,0 a 8,0 a partir de 10 ºC-85 ºC y se generaron curvas que representaban la elipticidad molar en función de la absorbancia para cada punto de pH. Se observó la forma de las curvas a través de los diferentes valores de pH. Todos los datos a pH 6,0 y superiores parecían tener transiciones similares que pueden estimarse visualmente a aproximadamente 55 ºC. Las curvas a pH 5,0 y 5,5 tienen transiciones más altas. Además, el pH 5,0 presentó el mayor grado de cambio (en valores de elipticidad) lo que señala el mayor aumento en el contenido de lámina β. Debido a que el aumento de láminas β es típico en las muestras aglutinadas, el pH 5,0 puede demostrar que la proteína ClfA es más propensa a la autoasociación a temperaturas elevadas.

Se midió la densidad óptica a 350 nm (DO_{350}) utilizando el espectrofotómetro de UV-visible Agilent 8453 y se midió la dispersión de la luz en ángulo recto utilizando el espectrofluorómetro Photon Technology International en función de la temperatura para observar aumentos en el tamaño de partícula que corresponderían a los aumentos en la intensidad de señal y posiblemente se correlacionarían con la agregación de la proteína ClfA. No se observaron transiciones notables en los trazos de temperatura a un pH de 4,0, 5,0 y 5,5, teniendo el pH 4,0 la mayor extensión de cambio (la mayor agregación). Por el contrario, el pH 6,0 y los superiores solo mostraron cambios pequeños y graduales hacia arriba indicativos de acontecimientos de autoasociación menores.

La dispersión de la luz de ángulo derecho es una técnica que es más sensible que la DO_{350} en la detección de oligomerizaciones (agregación). De acuerdo con los datos obtenidos de esta técnica, las primeras apariciones de agregación de ClfA se observaron a pH 5,0 y 5,5, mientras que los valores de pH más altos mostraron un retardo tan grande como de 15 ºC en el aumento de tamaño de partícula.

La estabilidad estructural de ClfA se caracterizó por calorimetría diferencial de barrido (CDB), que mide el cambio en la entalpía según se mide en kcal/mol/ºC. De acuerdo con el análisis por CDB, se observó que el desplegamiento de

ClfA era reversible con una sola transición observada a aproximadamente 55,5 ºC. Se calculó que la entalpía de esta transición era de aproximadamente 10 kcal/mol.

La T_f de ClfA también se midió en función de la concentración, que puede determinarse sistemáticamente de 0,1 mg/ml a 1,0 mg/ml. Se observó que la T_f de ClfA no cambia con el aumento de la concentración de proteínas, lo que indica que ClfA existe principalmente como monómero. Esta observación es coherente con los datos de cromatografía de exclusión por tamaño desvelados en el presente documento a continuación.

La T_f de ClfA también se determinó por CDB capilar en función del pH (Tabla 6). En estos experimentos, se observó que la T_f de ClfA alcanza una meseta entre el pH 5,0 y 8,0 a aproximadamente 55-56 ºC, aunque las T_f tienden a bajar a medida que aumenta el pH. La T_f de ClfA a pH 4,0 fue de solo 50,8 ºC, lo que indica la inestabilidad estructural de ClfA a este pH. Para estos experimentos de CDB, la concentración de ClfA era de 1,0 mg/ml. La T_f de ClfA determinada por CDB también se comparó con la T_f determinada por desplazamiento del pico de fluorescencia de triptófano (Trp) (citado anteriormente). La T_f determinada por fluorescencia de Trp era coherente con la T_f determinada por CDB entre el pH 4,0 y el pH 5,5. Sin embargo, la T_f determinada por fluorescencia de Trp disminuyó considerablemente cuando el pH aumentó de 6,0 a 8,0. Una posible explicación es que el dominio N3 se despliega según aumenta el pH de 6,0 a 8,0. Sólo existen dos triptófanos en la ClfA, de los cuales los dos se encuentran en el dominio N3. La disminución brusca de la T_f por fluorescencia de Trp según aumentó el pH de 6,0 a 8,0 indicó que estos restos estaban expuestos a un entorno más polar, lo que suele ser indicativo de desplegamiento de la proteína.

TABLA 6

pH	Tampón	T_f promedio
4,0	Acetato	50,8
5,5	Acetato	56,2
5,5	Succinato	55,3
6,0	Succinato	55,7
6,5	Succinato	55,6
7,0	Fosfato	55,0
8,0	Fosfato	54.8

El medicamento de ClfA puede entregarse en una jeringuilla precargada que está presiliconizada. Para evitar la agregación de las proteínas provocada por el aceite de silicona en el cuerpo de la jeringuilla y el émbolo, así como, entre otras cosas, para evitar la adsorción de las proteínas a una superficie de vidrio, con frecuencia se incluye polisorbato 80 (PS80) en la formulación final del medicamento. Puesto que el PS80 es un detergente, que potencialmente podría desestabilizar una proteína, la T_f de ClfA se evaluó en presencia de PS80. La Tabla 7 resume los resultados de experimentos de CDB capilar con ClfA 1,0 mg/ml en presencia o ausencia de polisorbato 80, que demostraron que la presencia de PS80 disminuyó la T_f de ClfA en aproximadamente 1 ºC, que es estadísticamente significativamente diferente de la T_f de la formulación de ClfA sin PS80.

TABLA 7

pH	[PS80]	Relación molar PS80:clfA	T_f promedio	DT
6,0	0	0,00	55,68	0,28
6,0	0,10 %	71,58	54,82	0,00
6,0	0,02 %	14,32	54,37	0,00
6,0	0,01 %	7,16	54,67	0,26

El efecto de $AlPO_4$ sobre la T_f de ClfA también se evaluó. Para medir la T_f de ClfA unida a $AlPO_4$, se formuló ClfA 0,1 mg/ml con succinato-solución salina a pH 5,0, en el que la mayor parte de la ClfA estaba unida a aluminio. La T_f de la ClfA unida se midió frente al tampón emparejado que contenía la misma concentración de fosfato de aluminio. El resultado de ese experimento demostró que la T_f de ClfA en particular no cambió cuando estaba unida a fosfato de aluminio (es decir, 56,16 ºC ± 0,12 ºC) en comparación con ClfA no unida (es decir, 56,34 ºC ± 0,15 ºC).

Para apoyar la selección del tipo de tampón, la concentración y la fuerza iónica del medicamento, el cambio en la T_f se determinó en formulaciones altas/bajas en sal y formulaciones de diferentes concentraciones de tampón de histidina y succinato. La Tabla 8 demostró que la T_f de ClfA aumentó a medida que aumentaba la concentración de

NaCl o la concentración de tampón succinato. Sin embargo, la T_f de ClfA no aumentó con ninguna de las formulaciones ensayadas de tampón de histidina-solución salina.

TABLA 8

Tipo de tampón/fuerza	**Cambio en la T_f (ºC)**
NaCl 0 mM, succinato 10 mM, pH 6,0	-0,94
NaCl 300 mM, succinato 10 mM, pH 6,0	1,38
NaCl 600 mM, succinato 10 mM, pH 6,0	3,43
Succinato 5 mM-solución salina, pH 6,0	-0,16
Succinato 50 mM-solución salina, pH 6,0	0,70
Histidina 5 mM-solución salina, pH 6,0	-0,41
Histidina 10 mM-solución salina, pH 6,0	-0,20
Histidina 50 mM-solución salina, pH 6,0	-0,25

Se seleccionaron excipientes de estabilizadores farmacéuticos conocidos, tales como azúcares, polioles y aminoácidos, por su impacto en la T_f de ClfA en comparación con la formulación base (ClfA 0,6 mg/ml en tampón succinato 10 mM, NaCl 150 mM, pH 6,0). La Tabla 9 muestra que los aumentos en la T_f de ClfA dependían de la concentración de $CaCl_2$, trehalosa, sacarosa, sorbitol, manitol y ácido glutámico. La arginina sin embargo disminuyó la T_f de ClfA. La prolina no tuvo un efecto significativo sobre la T_m de ClfA. El efecto de los excipientes sobre las proteínas es dependiente de la proteína, por tanto un experto habitual en la materia no sabrá qué efecto tendrá un excipiente a priori. La sacarosa, el sorbitol, el $CaCl_2$ y la alta concentración de NaCl no solo aumentaron la T_f sino que también aumentaron la ΔG a 4 ºC. La Tabla 10 muestra el efecto aditivo de los excipientes en la elevación de la T_m de ClfA en 2 ºC-3 ºC, incluso en presencia de PS80.

TABLA 9

Excipiente	**ΔT_f (ºC)**
$CaCl_2$ 5 mM	0,22
$CaCl_2$ 20 mM	1,43
Trehalosa al 2 %	0,23 %
Trehalosa al 5 %	0,81
Trehalosa al 10 %	1,88
Sacarosa al 2 %	0,37
Sacarosa al 5 %	0,73
Sacarosa al 10 %	1,84
Sorbitol al 2 %	0,57
Sorbitol al 5 %	1,12
Sorbitol al 10 %	2,36
Manitol al 2 %	0,66
Manitol al 5 %	1,11
Manitol al 10 %	1,33
Glicerol al 10 %	0,89
Ácido glutámico 10 mM	0,12
Ácido glutámico 100 mM	1,39
Arginina 10 mM	-0,02
Arginina 100 mM	-0,85
Prolina 100 mM	0,04

TABLA 10

Excipiente	**ΔT_f (ºC)**
Sacarosa al 5 %	0,89
Manitol al 5 %	1,19
$CaCl_2$ 10 mM	1,04
Sacarosa al 5 % + manitol al 5 %	2,39
Manitol al 5 % + $CaCl_2$ 10 mM	2,23
Sacarosa al 5 % + $CaCl_2$ 10 mM	2,08
Sacarosa al 5 % + manitol al 5 % + $CaCl_2$ 10 mM	3,85
NOF PS80 al 0,02 %	-0,34
Sacarosa al 5 % + manitol al 5 % + $CaCl_2$ 5 mM + NOF PS80 al 0,02 %	2,09
NaCl 300 mM + sacarosa al 5 % + manitol al 5 % + $CaCl_2$ 5 mM + NOF PS80 al 0,02 %	2,59
NaCl 500 mM + sacarosa al 5 % + manitol al 5 % + $CaCl_2$ 5 mM + NOF PS80 al 0,02 %	3,74
NaCl 150 mM + sacarosa al 5 % + manitol al 5 % + $CaCl_2$ 5 mM	1,96
Sacarosa al 5 % + manitol al 5 % + NOF PS80 al 0,02 %	1,42
NaCl 300 mM + sacarosa al 5 % + manitol al 5 % + NOF PS80 al 0,02 %	2,38
NaCl 500 mM + sacarosa al 5 % + manitol al 5 % + NOF PS80 al 0,02 %	3,64
NaCl 150 mM + sacarosa al 5 % + manitol al 5 %	1,70
NaCl 150 mM + sacarosa al 3 % + $CaCl_2$ 10 mM + NOF al 0,02 % NOF PS80 al 0,02 %	1,55
NaCl 300 mM + sacarosa al 3 % + $CaCl_2$ 10 mM + NOF PS80 al 0,02 %	2,28
NaCl 300 mM + sacarosa al 3 %+ $CaCl_2$ 10 mM	2,39
NaCl 150 mM + manitol al 3 % + $CaCl_2$ 10 mM + NOF PS80 al 0,02 %	1,69
NaCl 300 mM + manitol al 3 % + $CaCl_2$ 10 mM + NOF PS80 al 0,02 %	2,47

Las cargas superficiales netas de ClfA y $AlPO_4$ se obtuvieron en función del pH entre 4,0 y 8,0 para utilizarse como factores predictivos de la unión. Los sistemas tampón utilizados para el estudio fueron acetato (para pH 4,0-5,0), succinato (para pH 5,5-6,5) y fosfato (para pH 7,0-8,0). El perfil de potencial zeta de ClfA cruza el punto de carga cero en algún punto entre el pH 4,0 y 5,0. (El potencial zeta es la medida del potencial electrocinético de los agentes en un sistema coloidal. Véase Lyklema, J. "*Fundamentals of Interface and Colloid Science*", vol. 2, página 3208, 1995). Esto es coherente con el hecho de que ClfA posee un valor de pI en el 4s bajo. Además, también se descubrió que el perfil de potencial zeta de $AlPO_4$ era coherente con su pI de ~ 5,5-5,8. Por tanto, la mejor unión ocurriría cuando ambas entidades tengan cargas netas opuestas, aproximadamente entre pH 4,5-5,5. Los ensayos de Lowry indicaron que la mejor unión ocurrió a pH 5,0 a ambas concentraciones de ClfA 0,020 y 0,100 mg/ml. La tendencia contraria fue verdadera para la curva de $Al(OH)_3$, donde el pH 5,0 presentó la unión más baja. El $Al(OH)_3$ nunca alcanzó el 100 % de unión a ningún valor de pH ensayado.

Los experimentos de unión de titulación de concentración de $AlPO_4$ (0,25, 0,50, 0,75 mg/ml) se realizaron con ClfA a pH 0,5, 5,5 y 6,0. De acuerdo con estos experimentos, ClfA a pH 6,0 parecía insensible a la concentración de proteína sistemáticamente el ~50 % de unión, mientras que la proteína a pH 5,0 mostró un aumento en la unión concomitante a un aumento en AlPO4. Se observó que ClfA consigue la mejor unión a pH 5,0 y a concentraciones de proteína menores, con unión decreciente a medida que aumentaban las concentraciones. Además, el pH 5,5 y 6,0 mostraron ambos la misma tendencia, pero la unión no era adecuada para cualquiera de estos valores de pH, incluso a la dosis más baja.

En un intento de mejorar la unión a pH 6,0, se seleccionaron unos pocos excipientes, que incluían NaCl 150 mM, NaCl 500 mM, glicina 300 mM, lisina 300 mM, $MgCl_2$ 20 mM y EDTA1 mM, para su ensayo junto con diferentes concentraciones de NaCl. Muchos de los excipientes se eligieron de acuerdo a sus características catiónicas, ya que a pH 6,0, tanto ClfA como $AlPO_4$ están ambos cargados negativamente. Se utilizó un ensayo de Lowry modificado para el ensayo para determinar la proteína unida porcentual. De acuerdo con el ensayo, no se observó que ninguno de los excipientes mostrara una mejora marcada en comparación con el control de NaCl 150 mM.

Ejemplo 3: formulación de un medicamento liofilizado de clfa: sumario

En general se considera que ClfA es una proteína inestable, lo que significa que experimenta fácilmente la hidrólisis o el "corte" entre el dominio N1 y el dominio N2 para generar al menos dos fragmentos, de los cuales uno contiene el dominio N1 y otro contiene los dominios N2N3. Por estabilidad, lo que se quiere decir es la cantidad relativa de ClfA

no hidrolizado que contiene sustancialmente ClfA no degradado en comparación con los productos de degradación, que incluyen, por ejemplo, fragmentos de péptidos N1 y N2N3. Cuanto mayor sea la cantidad relativa de C1fA sustancialmente no degradado, más estable es la proteína.

Se observó que la proteína ClfA en una formulación líquida (citado anteriormente) sufrió de cortes entre los dominios N1 y N2N3, como se ve con HPLC de exclusión por tamaño. Después de la selección de excipientes cuidadosamente elegidos, la liofilización se investigó como una alternativa a la formulación líquida basándose en la inestabilidad del líquido. Se examinaron cuatro porciones de sustancia farmacológica ClfA utilizando una formulación de liofilización modificada de succinato 10 mM, pH 6,0, polisorbato 80 al 0,01 % y sacarosa al 4,5 % (agente de carga) en agua para inyección (API) (poco o nada de NaCl). Los resultados para los cuatro lotes indicaron que una formulación liofilizada de ClfA estabiliza satisfactoriamente la proteína a partir de cortes durante hasta tres meses en temperaturas a tiempo real y aceleradas (37 ºC). El análisis de la formulación utilizando HPLC de fase inversa mostró que la liofilización impidió otras modificaciones, tales como la desamidación y la oxidación a través de los puntos temporales observados. Además, los ensayos de potencia *in vitro* (es decir, los ensayos BioVeris) revelaron que ClfA mantiene su potencia durante tres meses.

Los medicamentos liofilizados también se caracterizaron mediante el uso de procedimientos biofísicos (pH, humedad por coulometría de Karl Fisher [véase Scholz, Eugen, *Fresenius' J. of Anal. Chem.*, 348 (4): 269-271, abril de 1994], DO_{350}, osmolalidad, dicroísmo circular, espectroscopía de absorción UV, calorimetría diferencial de barrido), procedimientos de separación (HPLC) y procedimientos de potencia (BioVeris) para controlar los efectos de la liofilización sobre la formulación (medicamento) y sobre la propia proteína (sustancia farmacológica). Los análisis utilizando diversos procedimientos señalaron que las proteínas características eran similares antes y después de la liofilización. Además, se realizaron experimentos de agitación, congelación-descongelación y de selección de excipientes como optimización preliminar para la formulación de liofilización.

Ejemplo 4: formulación de un medicamento liofilizado de clfa: liofilización

Antes de la liofilización, los viales se llenaron con 650 µl de formulaciones líquidas. Después de la liofilización, era necesario determinar un volumen de reconstitución con una jeringuilla de manera que el volumen de distribución tuviera en cuenta el espacio muerto dentro de la jeringuilla. En este experimento, las jeringuillas se llenaron con 0,55, 0,60, 0,65 y 0,70 ml de diluyente. El diluyente se extruyó en los viales liofilizados y el líquido reconstituido volvió a recoger en la jeringuilla. Después, se dispensó el líquido y se pesó en una báscula. Suponiendo que la densidad del líquido fuera de aproximadamente 1 g/ml, se determinó que el vial debía contener aproximadamente 0,65 ml de la vacuna con el fin de entregar aproximadamente 0,5 ml de la vacuna al paciente. Los volúmenes en exceso de 0,5 ml son aceptables, pero no se prefieren volúmenes de menos de aproximadamente 0,5 ml.

La recuperación por filtración de formulaciones líquidas previamente liofilizadas de dos lotes L36051-81-1 y L36051-81-2 se controló mediante ET-HPLC. El filtro utilizado fue una membrana Millipore de 0,22 µm de PVDF. La recuperación de ClfA para ambos lotes fue > 99 %.

Se utilizó un liofilizador Virtis Genesis EL35 para todas las formulaciones notificadas en el presente documento. Los parámetros de un ciclo de ejecución de liofilización a modo de ejemplo y no limitante se muestran en la Tabla 11. El lote L36051-44 (SF L35812-59) no incluía una etapa de recocido, mientras que los tres lotes restantes se prepararon con una etapa de recocido.

TABLA 11

	Temperatura en almacenamiento (ºC)	Velocidad/Retención	Tiempo (min)	Presión
Congelación	-50	0,3 ºC/min	183,3	400 mbar (40 kPa)
	-50	Retención	60	400 mbar (40 kPa)
	-10	0,3 ºC/min	133,3	400 mbar (40 kPa)
Recocido	-10	Retención	120	400 mbar (40 kPa)
	-50	0,3 ºC/min	133,3	400 mbar (40 kPa)
	-50	Retención	180	400 mbar (40 kPa)
Secado primario	-25	0,2 ºC/min	125	50 mTorr (6,65 Pa)
	-25	Retención	1320	50 mTorr (6,65 Pa)
Secado secundario	25	0,2 ºC/min	275	50 mTorr (6,65 Pa)
	30	Retención	720	200 mTorr (26,60 Pa)
	5	0,2 ºC/min	50	200 mTorr (26,60 Pa)
	5	Retención	hasta tapar	200 mTorr (26,60 Pa)
mTorr = militorr				

La humedad se midió mediante la química de Karl Fisher utilizando un coulombímetro de Brinkmann conectado a un horno de muestra. Se utilizó gas nitrógeno seco para llevar la humedad de la muestra a la cubeta de Karl Fisher. Un patrón de humedad seco al 5,5 % se utiliza para supervisar el rendimiento del sistema. Utilizando el horno, el nivel del agua se midió a 230 ºC y las muestras liofilizadas se midieron a 115 ºC. En general, un ciclo de liofilización satisfactorio contiene la menor cantidad de agua al tiempo que conserva todas las otras características del producto deseable.

Se inspeccionaron diez viales al azar de formulaciones después de la liofilización de cada lote y se evaluaron las características visuales. La calidad de la torta de lote a lote fue comparable, sin embargo, el lote L36051-44, que se preparó sin la etapa de recocido, mostró una mayor contracción que los otros lotes que incluían una etapa de recocido. En general, las tortas eran de color blanco y esponjosas, presentando una buena integridad estructural. Se muestran características visuales de 10 productos de liofilización individuales de un lote de formulación particular (con recocido) en la Tabla 12.

TABLA 12

N.º de vial	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Integridad del Vial										
Intacto	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí
Astillado	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
Fracturado, fisura	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
Fracturado, abierto	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
Integridad de las tortas										
Intacto	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí
Adhesión al vidrio	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
Contracción	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí
Colapso	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
Refusión	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
Astillado	no	no	no	no	sí	sí	sí	no	sí	no
Agrietado, fisura	no	no	no	no	sí	no	no	no	no	no
Agrietado, abierto	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
Características externas de las tortas										
Color	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco
Textura	Esponja gruesa	Esponja gruesa	Esponja gruesa	Esponja gruesa	Esponja gruesa	Esponja gruesa	Esponja gruesa	Esponja gruesa	Esponja gruesa	Esponja gruesa
Corteza	pequeña	pequeña	pequeña	pequeña	pequeña	pequeña	pequeña	pequeña	pequeña	pequeña
Lustre	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí
Poros	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
Burbujeo	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
Hinchamiento	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
Hace burbujas o espuma	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no

Se caracterizaron los atributos físicos de las formulaciones antes y después de la liofilización. Las muestras se reconstituyeron después de la liofilización con aproximadamente 630 µl de solución salina (el Lote 44 se reconstituyó con NaCl 150 mM, mientras que los otros lotes se reconstituyeron con NaCl 50 mM). La osmolalidad después de la reconstitución estuvo cerca de un objetivo fisiológico de -290 mOsm utilizando NaCl 50 mM. Se observó que los valores de pH se mantuvieron a 6,0 ± 0,3 cuando se reconstituyeron las tortas liofilizadas con diluyente. Además, los tiempos de reconstitución de todos los lotes fueron de menos de 30 segundos. Se generaron microburbujas transitorias tras la adición de diluyente a las tortas, como resultado de volver a llenar con nitrógeno durante el taponamiento.

Se utilizó un de CDB TA Instruments Modulated DSC para caracterizar la temperatura de transición vítrea (Tv') del líquido antes de la liofilización. La Tv' se define como la temperatura a la cual un sólido amorfo alcanza un estado frágil, vítreo con un alto nivel de enlaces de hidrógeno al enfriarse. Por encima de la Tv', se permite más fluidez molecular. La obtención experimental de Tv' es importante para la optimización del ciclo de liofilización con el fin de conseguir una torta de alta calidad y un producto estable. Se utilizó un instrumento de CDB modulada para las determinaciones de Tv' debido a su capacidad para explorar a temperaturas bajo cero.

La transición vítrea (Tv') y el contenido de humedad de las tortas se consideraron durante la optimización del procedimiento de liofilización. Es importante que la muestra esté por encima de su transición vítrea durante la fase de recocido de la liofilización. La etapa de recocido para la liofilización fue a -10 ºC, que está por encima de la Tv' de -34,6 ºC ± 0,8 ºC para todas las formulaciones. También es importante que el procedimiento de liofilización seque adecuadamente la torta para evitar las reacciones entre las proteínas y el agua, reduciendo de este modo la estabilidad y el período de validez del producto. El procedimiento de liofilización dio como resultado menos del 1 % (es decir, 0,42 % ± el 0,19 %) de agua para todas las formulaciones.

Ejemplo 5: formulación de un medicamento liofilizado de clfa: termoestabilidad

Se utilizó un MICROCAL VP-calorímetro diferencial de barrido (CDB) para caracterizar la estabilidad térmica intrínseca de ClfA. Un desnivel térmico de 10 ºC a 100 ºC reveló la temperatura a la que la proteína fusiona (T_f) y el cambio de entalpía (ΔH) requerido para el acontecimiento de desplegamiento (fusión). Esto proporciona información sobre las características de plegamiento de la proteína (es decir, estructuras secundaria y terciaria) y si la conformación había cambiado o no después de la liofilización.

Se realizó la calorimetría diferencial de barrido (CDB) utilizando el MicroCal Capillary DSC en lotes de ClfA antes y después de la liofilización para comparar las temperaturas de fusión (T_f) de las formulaciones. Todos los lotes analizados revelaron valores de T_f similares y entalpías de desplegamiento (ΔH) antes y después de la liofilización, lo que señala que el plegamiento global de la proteína no cambia antes de antes a después de la liofilización. La T_f promedio para antes de la liofilización fue de 55,2 ºC ± 0,14 ºC en comparación con 55,2C ± 0,16 ºC después de la liofilización. El ΔH promedio de antes de la liofilización fue de $1,90 \times 10^6 \pm 0,12 \times 10^6$ cal/mol/ºC en comparación con $1,90 \times 10^6 \pm 0,11 \times 10^6$ cal/mol/ºC después de la liofilización.

Ejemplo 6: formulación de un medicamento liofilizado de clfa: estructura secundaria del antígeno

Se utilizó dicroísmo circular (DC) para evaluar la estructura secundaria de la proteína en cada formulación antes y después de la liofilización. Todos los experimentos se realizaron en un espectropolarímetro Jasco J-810. Los parámetros experimentales para las exploraciones de DC incluían un intervalo de longitudes de onda de 190 nm-260 nm, velocidad de exploración de 20 nm/min, tiempo de respuesta de 2 segundos, ancho de banda de 1 nm y acumulación de 3. Se utilizó una matriz de tampón idéntica que contenía succinato, sacarosa y NaCl para la sustracción del fondo.

El dicroísmo circular (DC) proporciona huellas espectrales de estructuras secundarias de proteínas como la hélice α y la lámina β. Una comparación de los lotes antes y después de la liofilización de ClfA mostró que las formas generales de los espectros antes y después de la liofilización no cambiaron, lo que señala que todos los lotes mantuvieron sus estructuras secundarias durante el procedimiento de liofilización y reconstitución.

Ejemplo 7: formulación de un medicamento liofilizado de clfa: estructura terciaria del antígeno

La espectroscopia de absorción UV de segunda derivada se utilizó como otro procedimiento para examinar la estructura terciaria del antígeno para evaluar la estabilidad de la proteína intrínseca antes y después de la liofilización. Los espectros de absorción UV-visible de múltiples longitudes de onda se obtuvieron de 200 nm-400 nm con un espectrómetro de diodos en serie Agilent 8453 de UV-visible. Se utilizó una cubeta de cuarzo de 1 cm de longitud de paso con un volumen de 100 µl para todos los experimentos.

El análisis de los espectros se realizó con el software ChemStation™ (Agilent). Los espectros de segunda derivada se obtuvieron utilizando un filtro de datos de nueve puntos y se ajustaron a un polinomio de Savitzky-Golay de tercer grado. Los espectros derivados se interpolaron con 99 puntos de datos entre cada intervalo de un nanómetro, proporcionando una resolución eficaz de aproximadamente 0,01 nm en condiciones de no agregación. Se utilizó Microcal Origin™ 6.0 para seleccionar posiciones de los picos de los espectros derivados. Se identificaron posiciones de los picos correspondientes a los restos de aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptófano y se

representaron en función de la temperatura.

En tres de los cuatro lotes (Lotes -44, -81-1 y -81-2), se observaron algunas diferencias en las regiones de fenilalanina/tirosina (260 nm a 270 nm) después de la liofilización. Sin embargo, el lote -72 mostró una buena superposición. Este lote contenía el NaCl residual más alto (datos procedentes de la matriz a granel).

Ejemplo 8: formulación de un medicamento liofilizado de clfa: estabilidad estructural: corte de n1

Se utilizó HPLC de exclusión por tamaños para evaluar la calidad inicial del medicamento antes de la liofilización, del medicamento reconstituido después de la liofilización y el medicamento reconstituido mantenido a distintas temperaturas en el tiempo para estudios de estabilidad. Este procedimiento es capaz de detectar especies de ClfA de diferentes tamaños, incluyendo monómeros, dímeros, oligómeros (más grandes que dímero) y productos de degradación (debido a la escisión entre los dominios N1 y N2N3) por lo que se utilizó como una de las técnicas principales para comparar las estabilidades de formulaciones líquidas antes de la liofilización con sus homólogos liofilizadas.

La estabilidad de las formulaciones líquidas y liofilizadas de ClfA a 2-8 ºC, 25 ºC y 37 ºC se controló mediante dos procedimientos de HPLC. Se utilizó HPLC de exclusión por tamaño para detectar la escisión de los dominios N1 y N2N3 mientras que se utilizó HPLC en fase inversa para controlar cualquier degradación química (es decir, desamidación, oxidación) de la proteína en el tiempo.

La Figura 2, paneles A, B, C y D ilustran las representaciones cinéticas de primer orden de cuatro lotes liofilizados de ClfA en comparación con sus homólogos líquidos, todos incubados a 2-8 ºC, 25 ºC y 37 ºC y controlados en el tiempo por ET-HPLC. Los resultados se representaron gráficamente como ln[C] en función del tiempo, donde C es la concentración del antígeno intacto (dímero + monómero) mientras que excluye los productos de degradación escindidos. Los cuatro lotes muestran una estabilidad uniforme del producto liofilizado a las tres temperaturas de incubación, como se indica por el cambio mínimo en C durante hasta tres meses. Por el contrario, las muestras de líquido antes de la liofilización muestran un aumento de la velocidad de degradación proporcional con temperaturas crecientes. Ha de observarse que el lote L36051-44 homólogo líquido (L36051-37-1) es la formulación líquida (en contraposición a una formulación antes de la liofilización) que contiene succinato 10 mM, pH 6,0, polisorbato 80 al 0,01 % y NaCl 150 mM (Figura 2A). Sin embargo, las tendencias globales del lote -37-1 en función de la temperatura son similares a las de los líquidos antes de la liofilización.

La Figura 3 ilustra cromatogramas representativos de ET-HPLC de la SF L40184-61 liofilizado a t = 0 en comparación con las tortas almacenadas a 2-8 ºC, 25 ºC y 37 ºC durante tres meses. Los perfiles de los cromatogramas apilados parecen idénticos, sin aumento aparente en los picos de dímeros o de productos de degradación. Los otros tres lotes liofilizados mostraron resultados similares.

Se realizó una comparación de un líquido (antes de la liofilización) y un lote de formulación liofilizada de ClfA. Se muestran cromatogramas representativos de ET-HPLC en la Figura 4 que comparan la formulación liofilizada con los líquidos antes de la liofilización después de haber sido almacenados a 2-8 ºC, 25 ºC y 37 ºC durante cuatro semanas. Las muestras liofilizadas mostraron buena superposición en las tres temperaturas de almacenamiento, en particular alrededor de la región de productos de degradación a la derecha inmediata del pico principal de monómeros. Por el contrario, las formulaciones líquidas mostraron un marcado aumento en los picos de productos de degradación (Fig. 4, con un círculo). Además, los picos liofilizadas mostraron una menor presencia de picos de oligómeros (a la izquierda del pico principal de monómeros, Fig. 4), un atributo que fue común a todos los lotes liofilizados.

Ejemplo 9: formulación de un medicamento liofilizado de clfa: estabilidad estructural: modificaciones de las proteínas

La HPLC de fase inversa es un procedimiento analítico utilizado con frecuencia para proporcionar la caracterización de la calidad y la integridad de proteínas. La separación de los analitos se basa en la diferencia en la hidrofobia de las diferentes especies, que pueden variar significativamente de proteína a proteína. Como resultado, un ensayo de HPLC de fase inversa normalmente puede proporcionar una buena separación entre la proteína de interés y, por ejemplo, productos de degradación de proteínas, la proteína con modificaciones de la secuencia (tales como la desamidación y la oxidación) e impurezas de proteínas de células hospedadoras residuales, además de la escisión. Este ensayo se utilizó para proporcionar datos acerca de la calidad de la proteína en el tiempo en los estudios de estabilidad.

Al igual que con los datos de ET-HPLC, los cromatogramas de fase inversa muestran perfiles similares para el producto liofilizado después de tres meses a 37 ºC, 25 ºC y 2-8 ºC, en comparación con la fórmula recién fabricada.

Durante el curso del estudio de estabilidad liofilizada se controlaron el pH, la humedad y la DO_{350}. Los valores de pH deben permanecer dentro de ± 0,03 unidades del pH objetivo y la humedad debe ser < 3 %. La DO_{350} es una medida de la luz dispersada por las partículas agregadas. Normalmente, la ausencia de agregados detectables devolverá números de DO_{350} de < 0,03. La Figura 5, paneles A, B y C son los datos combinados de múltiples lotes liofilizados, que demuestran que los tres parámetros muestran buena estabilidad durante tres meses.

Ejemplo 10: formulación de un medicamento liofilizado de clfa: potencia determinada mediante bioveris

Se utilizó un ensayo de potencia *in vitro* para evaluar la persistencia de un epítopo funcional de la proteína ClfA en puntos temporales seleccionados en el estudio de estabilidad. La plataforma BIOVERIS se utilizó para este fin. En este ensayo, se empleó un formato sándwich en el que se utilizó un anticuerpo monoclonal (mAb 12-9) para capturar el antígeno y se utilizó otro anticuerpo monoclonal (mAb 15EC6) generado contra un epítopo diferente para detectar la presencia de antígeno con detección ECL. El anticuerpo monoclonal 12-9 es un anticuerpo que reconoce y se une al dominio N3 de ClfA, mientras que mAb 15EC6, reconoce y se une al dominio N2 de ClfA.

Se empleó el sistema de ensayo de competencia de anticuerpos BIOVERIS para controlar la potencia de la ClfA en los lotes L36051-81-1 (SF L40184-61) y L36051-81-2 (SF L40184-62) durante un máximo de tres meses. Las formulaciones líquidas tanto liofilizadas como antes de la liofilización no mostraron ninguna disminución en la potencia durante el período de 3 meses a 2-8 ºC, 25 ºC y 37 ºC.

Ejemplo 11: formulación de un medicamento liofilizado de clfa: el efecto de los excipientes

Después de que se hubiera establecido la estabilidad de ClfA, se planificaron estudios adicionales (1) para establecer especificaciones para los componentes de ls formulación, (2) para la selección de excipientes para optimizar las características externas de las tortas, (3) para entender el procedimiento de formulación en el contexto del diseño de procedimientos y (4) para examinar la tolerancia a la congelación-descongelación de la sustancia farmacológica y el medicamento.

Se realizó una titulación de polisorbato 80 (PS80) en una matriz de tampón de liofilización que contenía ClfA 0,2 mg/ml y succinato 10 mM, pH 6,0, mientras que el contenido de sacarosa variaba del 3 % al 4,5 % al 6 % p/v. Las concentraciones de PS80 variaron de cero (0) a 0,005 % a 0,01 % v/v. Este experimento se realizó para (1) determinar la necesidad de polisorbato en una formulación líquida antes de la liofilización, (2) establecer una concentración de especificación para el polisorbato en una formulación líquida antes de la liofilización y (3) para establecer también una especificación para la concentración de sacarosa en una formulación líquida antes de la liofilización.

Se realizó un experimento de agitación con concentraciones variables de PS80 y sacarosa. La Figura 6, paneles A, B y C muestran los resultados de porcentaje de dímeros, porcentaje de monómeros y porcentaje de productos de degradación (escisión) por ET-HPLC después de 24 horas de agitación a temperatura ambiente para las formulaciones L40184-61 (C1fA 200 µg/ml, sacarosa al 6 %, succinato 10 mM pH 6,0, PS80 al 0,005 %) y L401840-62 (C1fA 200 mg/ml, sacarosa al 4,5 %, succinato 10 mM, pH 6,0, PS80 al 0,01 %). Las formulaciones que no contenían PS80 mostraron un aumento en el porcentaje de formación de dímeros después de la agitación con respecto al t = 0 de la muestra (Figura 6D). En presencia de incluso la cantidad más baja de PS80 (0,005 %), la cantidad de dimerización es menor que la del t = 0, lo que señala que el PS80 fue beneficioso para la formulación. Además, el análisis por ET-HPLC del control "sin PS80" mostró la presencia de oligómeros de orden superior (más grandes que los dímeros) después de la agitación, mientras que las muestras que contenían PS80 no. Por tanto, la recomendación para Polisorbato 80 se estableció en el 0,01 ± el 0,005 %. Las cantidades variables de sacarosa (3, 4,5 y 6 %) no mostraron diferencias en los datos de la CET. Además, los porcentajes de monómeros y productos de degradación no parecieron verse afectados en gran medida por la presencia o ausencia de PS80 o con cantidades variables de sacarosa.

Se realizaron estudios de mezcla para determinar si diversos excipientes tendrían un efecto adverso sobre ClfA durante la formulación/etapa de mezcla del procedimiento de fabricación. Los diversos excipientes incluían sacarosa al 0 % y al 5 %, trehalosa al 0 % y al 5 % y una combinación de sacarosa y manitol al 4 % de sacarosa y 1 % de manitol. Los excipientes se eligieron en base a su uso habitual en la liofilización. Para estos experimentos, la base de formulación incluía ClfA 0,3 mg/ml, succinato 10 mM, pH 6,0 y polisorbato 80 al 0,01 %. Las muestras se formularon, se almacenaron durante la noche a 2-8 ºC y se iniciaron los estudios la mañana siguiente. Las formulaciones se colocaron en viales de vidrio Shott de tipo 1 de 30 ml con tapones de butilo gris West 4432 y se montaron en un agitador de microplacas VWR. Los viales se mezclaron a una velocidad de 500 rpm continua a temperatura ambiente y se tomaron muestras en t = 0, 2, 4, 8 y 24 horas utilizándose ET-HPLC como ensayo primario.

Se examinaron varios lotes (L36051-96-1, L36501-96-2, L36051-96-3, L36051-96-4, L36051-100-1 y L36051-100-2) en los estudios de mezcla para determinar si la sacarosa, la trehalosa y la sacarosa/manitol tienen un efecto sobre la estabilidad de ClfA cuando se mezclan durante 24 horas a temperatura ambiente. La Figura 7, paneles A, B y C representan el porcentaje de productos de degradación (escisión), el porcentaje de dímeros y el porcentaje de monómeros notificado por ET-HPLC para cada formulación en el transcurso del tiempo. No se observó ninguna degradación importante con la sacarosa sola ni con las muestras de sacarosa/manitol; sin embargo, la formulación de trehalosa mostró una mejora significativa de la degradación. La velocidad de dimerización fue comparable para ambos lotes de SF de ClfA con la sacarosa sola, pero se observó un aumento de dímeros dependiente del lote con trehalosa y sacarosa/manitol. Los cambios en monómeros reflejaron los cambios en los productos de degradación y dímeros.

Se formularon diversas combinaciones de sacarosa, metionina, glicina y manitol con ClfA y posteriormente se sometieron a ensayo para determinar la estabilidad de ClfA por medio de ensayos de estabilidad acelerados. Los ensayos de estabilidad acelerados implican el almacenamiento de una formulación (líquida o liofilizada) a una temperatura que es más alta que la temperatura de almacenamiento prevista y el control de la proteína ClfA en el tiempo en busca de signos de degradación. En el caso de la ClfA liofilizada, la temperatura de almacenamiento recomendada es de 2 a 8 ºC, por lo que 25 ºC y 37 ºC se considerarían condiciones "aceleradas". Se fabricaron ocho formulaciones (véase la Tabla 13), cada una de los cuales contenía ClfA 0,300 mg/ml, succinato 10 mM pH 6,0 y polisorbato 80 y que contenían diferentes combinaciones de sacarosa, metionina, glicina y manitol, para examinar su efecto sobre (1) la estabilidad de ClfA en líquido antes de la liofilización, (2) la estabilidad de las tortas liofilizadas y (3) las características externas de las tortas liofilizadas. Se eligió la metionina por su capacidad para evitar la oxidación de la proteína, la glicina por sus atributos generales de estabilización a través de volumen excluido y el manitol por su propensión a mejorar las características externas de la torta. Las formulaciones líquidas se colocaron en estabilidad acelerada y se controlaron durante una semana por ET-HPLC y FI-HPLC a las dos semanas. Las tortas liofilizadas se almacenaron a 2-8 ºC y 37 ºC y se controlaron a los dos meses. Las características externas de las tortas se evaluaron visualmente en relación con la formulación de sacarosa solamente.

TABLA 13

N.º de muestra	Proteína ClfA	Succinato tampón mM	% de Sacarosa	% de PS 80	Metionina mM	% de glicina	% de Manitol	pH
1	200	10	4,5	0,01	0	0	0	6,0
2	200	10	4,5	0,01	0	2	0	6,0
3	200	10	4,5	0,01	25 mM	0	0	6,0
4	200	10	4,5	0,01	25 mM	2	0	6,0
5	200	10	4,5	0,01	0	0	1	6,0
6	200	10	4,5	0,01	0	2	1	6,0
7	200	10	4,5	0,01	25 mM	0	1	6,0
8	200	10	4,5	0,01	25 mM	2	1	6,0

Los datos de exclusión de tamaño para las muestras líquidas a 2 -8 ºC, 25 ºC y 37 ºC después de una semana mostraron que ninguno de los excipientes examinados mejoró la estabilidad de ClfA (en términos de escisión) en comparación con el control de sacarosa solo (formulación - 109-1). A t = 0, todas las formulaciones tenían perfiles muy similares. Todas las formulaciones mostraron una ligera pérdida de la altura del pico principal en función de la temperatura, junto con un aumento simultáneo de picos más pequeños que flanquean el pico principal, provocado por los productos de degradación. Se observó que la presencia de los diversos excipientes no mostró ninguna mejora notable con respecto a la formulación de sacarosa sola.

Adicionalmente, las formulaciones se liofilizaron y se inspeccionaron las características externas de las tortas. En comparación con el control de sacarosa sola, ninguno de los excipientes en las proporciones ensayadas ofreció ninguna mejora en la calidad visual de las tortas. Las tortas liofilizadas también se sometieron a ensayos de estabilidad y se examinaron para determinar la degradación (escisión) con ET-HPLC después de dos meses a 2-8 ºC y 37 ºC. Los resultados indicaron que todas las formulaciones eran estables.

Ejemplo 12: formulación de un medicamento liofilizado de clfa: cogelación-descongelación

Se realizaron estudios de congelación-descongelación sobre varios lotes de la proteína ClfA (es decir, L40184-63, -64 y -65). La formulación comprendía ClfA 0,2 mg/ml, succinato 10 mM, pH 6,0, sacarosa al 4,5 % p/v y polisorbato 80 al 0,01 % v/v. El estudio se dividió en tres grupos: (1) congelación-descongelación 3 veces de ClfA no formulada (sustancia farmacológica); (2) congelación-descongelación 3 veces de ClfA formulada (medicamento); y (3) sustancia farmacológica congelado y descongelada tres veces y formulada en medicamento después de cada descongelación. El análisis se realizó utilizando ET-HPLC.

El fin del estudio era evaluar la estabilidad de la proteína después de múltiples ciclos de congelación-descongelación en forma de una sustancia farmacológica y de un medicamento. Las muestras se analizaron después de cada descongelación utilizando ET-HPLC para detectar cualquier cambio en la degradación (escisión) de ClfA. Se observó que tres acontecimientos de congelación-descongelación no mostraron aumento de la degradación hacia a la tercera descongelación para dos de los tres lotes examinados. Un lote en particular, mostró mayores cambios en la degradación que los demás.

Ejemplo 13: formulación de un medicamento liofilizado de clfa/pc5/pc8 (tri-antígeno)

Basado en el éxito de la estabilización de ClfA por liofilización, se formularon medicamentos adicionales combinando ClfA con antígenos de Staphylococcus PC5 y PC8 y conjugados con CRM. Algunas realizaciones de la formulación líquida (antes de la liofilización o después de la reconstitución) contienen 200 µg de rClfA*m* y 100 µg de cada uno de los conjugados PC5-CRM_{917} y PC8-CRM_{917} por 0,5 ml de producto. En algunas realizaciones, la formulación líquida

contiene 100µ9 de rClfA*m* y 50 µg de cada uno de conjugados PC5-CRM_{917} y PC8-CRM_{917} por 0,5 ml de producto.

Se evaluaron varios agentes de carga, incluyendo la sacarosa, el manitol y la trehalosa. Se observó que la sacarosa ofrecía la mejor estabilidad basándose en los estudios de mezcla, las características externas de las tortas y la estabilidad líquida a corto plazo.

La estabilidad acelerada a corto plazo de formulaciones líquidas basada en tres lotes a pH variable señaló que el pH 6,0 es óptimo. Los conjugados PC5- y PC8-CRM_{197} eran estables dentro de un intervalo de pH de 5,0 a 7,0.

Varios sistemas tampón, que tamponan alrededor del pH 6, incluyendo succinato e histidina, se sometieron a ensayo. No se observó ninguna diferencia en la temperatura de fusión (T_f) de rClfAm utilizando tampones de histidina o succinato. Ambos tampones eran compatibles con los dos conjugados con PC5 y PC8 de CRM_{197}. Se eligió el tampón succinato 10 mM (pH 6,0) para continuar.

Se sometió a ensayo el polisorbato 80 (PS80) como estabilizador potencial en los estudios de agitación. Los estudios de agitación imitan el cizallamiento y el esfuerzo de transporte, que generalmente pueden conducir a un aumento de dímeros u oligómeros de orden superior. El resultado de estos experimentos señala que el PS80 evita la agregación de ClfA. Se eligió el polisorbato 80 al 0,01 % (del 0,005 al 0,15 %) para continuar.

Para la reconstitución del producto liofilizado, se eligió un diluyente que logra la osmolalidad fisiológica (es decir, de 250 a 300 mOsM). En una realización, se eligió NaCl 60 mM como el diluyente. Basándose en la capacidad para administrar una dosis de 0,5 ml después de la reconstitución, se eligió un volumen de llenado de 0,64 a 0,66 ml por vial. Para asegurar un volumen reconstituido de 0,64 a 0,66 ml para entregar una dosis de 0,5 ml, se eligió un volumen de llenado de 0,66 a 0,68 ml por jeringuilla.

Se determinó que la formulación de diluyente era óptima a 60 mM para la reconstitución de una torta de tri-antígeno liofilizada para conseguir una osmolalidad casi fisiológica de ~300 mOsM. La sacarosa al 4,5 % en la formulación hace una contribución significativa a la osmolalidad del medicamento líquido, lo que hace una osmolalidad de aproximadamente 200 mOsM sin ninguna sal adicional.

Se eligieron parámetros de liofilización para generar una torta que fuera de color blanco y esponjoso, sin refusión o encogimiento y que produjera una solución transparente que tuviera un pH de 6,0 ± 0,3 después de la reconstitución con NaCl 60 mM.

Ejemplo 14: proceso para la formulación de un medicamento de tri-antígeno

Se fabricó una formulación líquida de ejemplo que comprendía succinato 10 mM, pH 6,0, sacarosa al 4,5 % y Polisorbato 80 al 0,01 %, se filtró con una membrana Millipore de 0,22 µm de PVDF en alícuotas de **650 µl** por vial de 2 ml, y se liofilizó utilizando el ciclo que se describe a continuación. Las tortas liofilizadas se reconstituyeron con jeringuillas precargadas con NaCl 60 mM como diluyente.

En una realización, la formulación líquida se montó como se indica a continuación: (a) se combinaron sacarosa al 25 %, succinato 100 mM pH 6, PS80 al 1 % y API para obtener succinato 10 mM, sacarosa al 4,5 % y PS80 al 0,01 %. (b) La cantidad apropiada de rClfA*m*, conjugado de PC5 y conjugado de PC8 se añadieron a la mezcla de (a), que era después (c) se esterilizó a través de un filtro de 0,22 µm, (d) los viales de liofilización se llenaron cada uno con 0,65 ml ± 0,1 ml de la solución filtrada, (e) se liofilizaron de acuerdo con los parámetros de la Tabla 14, (f) se taparon, (g) se sellaron y (h) se etiquetaron. El medicamento liofilizado se almacenó a 2-8 ºC.

Tabla 14: Ciclo de liofilización

	Temperatura en almacenamiento (ºC)	**Velocidad/Retención**	**Tiempo (min)**	**Presión (mTorr)**
Congelación	-50	0,3 ºC/min	183,3	Por defecto[a]
	-50	Retención	60	
	-10	0,3 ºC/min	133,3	
Recocido	-10	Retención	120	
	-50	0,3 ºC/min	133,3	
	-50	Retención	180	
Secado primario	-25	0,2 ºC/min	125	50 (6,65 Pa)
	-25	Retención	1320	50 (6,65 Pa)

(continuación)

	Temperatura en almacenamiento (ºC)	Velocidad/Retención	Tiempo (min)	Presión (mTorr)
Secado secundario	25	0,2 ºC/min	275	50 (6,65 Pa)
	30	Retención	720	200 (26,60 Pa)
	5	0,2 ºC/min	50	200 (26,60 Pa)
	5	Retención	hasta tapar	200 (26,60 Pa)
a. Por defecto significa 400 mbar (40 kPa) (~ el 40 % de la temperatura atmosférica)				

Se realizaron dos diseños experimentales para determinar la influencia de los ingredientes activos e inactivos en el procedimiento de formulación, la recuperación después de la filtración y liofilización. Las variables principales fueron la concentración de rClfA*m* y los conjugados de PC5 y PC8 (objetivo del ± 30 %). La recuperación global de estos componentes de la formulación a la liofilización ha demostrado ser mayor del 95 % para todas las formulaciones. El análisis de los datos (utilizando el software DESIGN EXPERT) señaló lo siguiente: (a) la pureza de rClfA*m* no se ve afectada por la concentración de rClfA*m* dentro de las limitaciones del ensayo, en el que la dosis baja (70 µg/ml) presentó una pureza máxima medida del ~93 % y la dosis alta (520 µg/ml) presentó una pureza máxima medida del ~97 %; (b) la concentración de conjugados de PC5 y PC8 puede influir en la recuperación de los conjugados individuales, pero no obstante permanece dentro de las capacidades del ensayo; y (c) ninguno de los tres componentes está influenciado por la concentración de PS80. Los resultados se representan en la Tabla 15.

Tabla 15: Análisis de la formulación de tri-antígeno después de la liofilización

Número de lote	Conc. de rClfA*m* (µg/ml)	Pureza de rClfA*m* (%)	PC5 (µg/ml)	PC8 (µg/ml)	pH	Aspecto	Humedad (%)	Tiempo de Recon
1	74	93,5	36,4	38,5	6,08	TI[a]	0,50	< 30 s
2	573	97,2	35,8	39,3	6,05	TI	0,62	< 30 s
3	79	93,8	299,6	28,5	6,08	TI	0,81	< 30 s
4	543	97,2	292,5	26,0	6,06	TI	1,02	< 30 s
5	76	93,6	29,8	311,8	6,07	TI	0,67	< 30 s
6	550	97,5	26,8	321,7	6,06	TI	1,03	< 30 s
7	75	93,5	251,4	243,3	6,08	TI	0,87	< 30 s
8	544	97,4	263,4	250,7	6,05	TI	0,93	< 30 s
9	395	97,1	201,2	195,8	6,05	TI	0,95	< 30 s
10	106	95,4	52,9	57,9	6,05	TI	0,56	< 30 s
11	396	97,7	201,4	201,5	6,06	TI	1,11	< 30 s
12	101	95,1	49,8	53,8	6,07	TI	0,62	< 30 s
Promedio de recuperación	105,3	95,7	100,0	102,8	6,1	NA	0,81	NA
DT	4,2	1,8	10,6	15,0	0,0	NA	0,21	NA
[a] TI Transparente e incoloro. Basándose en el análisis de datos del % de pureza, la concentración de ClfA en la formulación influye en la capacidad del ensayo. La especificación será > 90 % para la dosis baja.								

En otros experimentos, el pH (que va desde 5,7 hasta 6,3, siendo el objetivo 6,0), el succinato (5 mM a 15 mM, siendo el objetivo 10 mM), el Polisorbato 80 (del 0,005 % al 0,15 %, siendo el objetivo el 0,01 %) y la sacarosa (del 3,0 % al 6,0 %, siendo el objetivo el 4,5 %) se variaron en la formulación. Los resultados, que se muestran en la Tabla 16, indican que los criterios de aceptación para los medicamentos activos (rClfA*m* (397 ± 6,7 µg/ml), conjugado PC5-CRM_{197} (179,8 ± 64,0 µg/ml) y PC8-CRM_{197} (conjugado 188,2 ± 10,5 µg/ml)) se encuentran dentro del intervalo de control.

Tabla 16: Análisis del tri-antígeno para los ingredientes inactivos

	Formulaciones				Resultados				
	pH objetivo	Succinato (mM)	PS 80 (%)	Sacarosa (%)	pH	% de Pureza de rClfA*m*	Fuerza de rClfA*m* (µg/ml)	Fuerza de PC5 (µg/ml)	Fuerza de PC8 (µg/ml)
1	6,0	10	0,01	4,5	6,07	97,9	390	181,6	187,2

(continuación)

	Formulaciones				Resultados				
	pH objetivo	**Succinato (mM)**	**PS 80 (%)**	**Sacarosa (%)**	**pH**	**% de Pureza de rClfA*m***	**Fuerza de rClfA*m* (µg/ml)**	**Fuerza de PC5 (µg/ml)**	**Fuerza de PC8 (µg/ml)**
2	5,7	15	0,015	6,0	5,75	97,9	410	175,6	184,8
3	5,7	5,0	0,005	3,0	5,83	98,1	400	183,2	200,0
4	5,7	5,0	0,015	6,0	5,83	98,0	400	178,0	183,7
5	5,7	15,0	0,005	3,0	5,75	97,9	400	174,2	166,7
6	6,3	15,0	0,005	6,0	6,32	98,0	390	186,8	199,7
7	6,3	15,0	0,015	3,0	6,31	98,3	400	179,6	183,3
8	6,3	5,0	0,015	3,0	6,27	98,2	400	181,9	196,9
9	6,3	5,0	0,005	6,0	6,28	98,1	390	177,4	191,7
Promedio	6,0	10,0	0,01	4,5	6,0	98,0	397,8	179,8	188,2
DT	0,3	5,0	0,005	1,5	0,3	0,1	6,7	4,0	10,5
Mí	5,7	5,0	0,005	3,0	5,75	97,9	390	174,2	166,7
Máx	6,3	15,0	0,015	6,0	6,32	98,3	410	186,8	200
Ingredientes activos mantenidos constantes a rClfA*m* 400 µg/ml, PC5 200 µg/ml y PC8 200 µg/ml.									

Se muestran datos de los lotes de formulación representativos en las Tablas 17 y 18. Se formularon tres lotes representativos, se cargaron y se liofilizaron a la dosis alta (rClfA*m* 400 µg/ml, cada uno de los conjugados de PC5- y PC8-CRM_{197} 200 µg/ml) y dos a la dosis baja (rClfA*m* 200 µg/ml, cada uno de los conjugados de PC5- y PC8-CRM_{197} 50 µg/ml). Las formulaciones están bien dentro de los criterios de aceptación objetivo para la pureza, la fuerza, la humedad, el aspecto y el pH. Estos datos se utilizan para delimitar las dosis de nivel medio17:

Tabla 17: Análisis de datos de t = 0 de formulaciones de dosis altas

Ensayos	**1**	**2**	**3**	**Promedio ± DT**
Aspecto	pbe[a]	pbe	pbe	NA
Tiempo de reconstitución	< 30 seg	< 30 seg	< 30 seg	Na
pH	5,97	6,10	6,07	6,05 ± 0,07
Humedad	0,64	0,73	0,69	0,69 ± 0,05
Pureza de rClfA*m* (%)	97,5	98,5	97,9	98,0 ± 0,5
Fuerza de rClfA*m* (µg/ml)	410	430	390	410 ± 20
Fuerza de PC5 (µg/ml)	187	183	182	184 ± 3
Fuerza de PC8 (µg/ml)	165	179	187	177 ± 11
Identidad de rClfAm	positiva	positiva	ND	NA
Identidad de polisacárido PC5 y PC8	positiva	positiva	ND	NA
Identidad de CRM_{197}	positiva	positiva	ND	NA

[a] torta de color blanco y esponjosa

Tabla 18: Análisis de datos de t = 0 de formulaciones de dosis bajas

Ensayos	**1**	**2**	**3**	**Promedio ± DT**
Aspecto	pbe[a]	pbe	pbe	NA
Tiempo de reconstitución	< 30 seg	< 30 seg	< 30 seg	NA
pH	5,96	6,05	6,08	6,053 ± 0,06
Humedad	0,37	0,56	1,49	0,81 ± 0,60
Pureza de rClfA*m* (%)	95,5	95,4	95,4	95,4 ± 0,1
Fuerza de rClfA*m* (µg/ml)	110,0	106,0	108	108 ± 2
Fuerza de PC5 (µg/ml)	49,0	53,0	47,0	50 ± 3

(continuación)

Ensayos	1	2	3	Promedio ± DT
Fuerza de PC8 (µg/ml)	47,0	58,0	51,0	52 ± 6
Identidad de rClfAm	positiva	positiva	ND	NA
Identidad de polisacárido PC5 y PC8	positiva	positiva	ND	NA
Identidad de CRM_{197}	positiva	positiva	ND	NA
[a] torta de color blanco y esponjosa				

Ejemplo15: estabilidad del fármaco de tri-antígeno

Se realizaron ensayos de estabilidad en seis lotes de formulaciones de tri-antígeno liofilizadas. Algunos de los ensayos claves eran la cromatografía de fase inversa (por ejemplo, FI-HPLC) para determinar la fuerza y pureza de rClfAm y nefelometría para determinar la fuerza de PC5-CRM_{197} y PC8-CRM_{197}. Las tortas liofilizadas se colocaron a 2 ºC-8 ºC, 25 ºC y 37 ºC y se analizaron en los puntos temporales seleccionados. Las tortas se reconstituyeron inmediatamente antes del ensayo. Los resultados de los ensayos no muestran ningún cambio en la fuerza (concentración) o la pureza de rClfA*m* ni en la fuerza (antigenicidad) de los conjugados después de cuatro semanas en la forma seca (Figuras 8 y 9). También se determinaron la concentración y pureza de rClfA*m* y la concentración (antigenicidad) de PC5-CRM_{197}/PC8-CRM_{197}, por FI-HPLC y nefelometría, respectivamente, para períodos de hasta tres meses. El análisis de regresión lineal realizado en las muestras almacenadas a 2 ºC y 8 ºC indica que las muestras son estables durante un mínimo de seis meses (Figuras 8 y 9). Las muestras se sometieron a ensayo tanto a dosis bajas (L36686-3-2 y L360510195-2) (Tablas 19-22) como altas (L36686-3-1 y L36686-25) y.

Tabla 19: Estabilidad del tri-antígeno formulado a rClfA*m* 400 µg/ml y conjugados de PC5- y PC8- 200 µg/ml (L36686-3-1)

Ensayos	2-8 ºC			TA		37 ºC	
	t = 0	4 semanas	3 meses	2 semanas	4 semanas	2 semanas	4 semanas
Aspecto	peb	peb	peb	peb	peb	peb	peb
pH	5,97	5,95	5,97	5,96	5,96	5,96	5,96
Concentración de rClfAm (µg/ml)	410	400	430	410	410	410	410
Pureza de rClfAm (%)	97,5	97,1	97,4	97,3	97,2	97,6	97,3
Antigenicidad de PC5-CRM_{197} (µg/ml)	187	188	190	184	202	167	193
Antigenicidad de PC8-CRM_{197} (µg/ml)	165	171	161	160	171	164	180
Humedad (%)	6,05 ± 0,16	6,05 ± 0,06	6,05 ± 0,03	ND	1,15 ± 0,07	ND	6,05 ± 0,20
[a] torta de color blanco y esponjosa							

Tabla 20: Estabilidad del tri-antígeno formulado a rClfA*m* 400 µg/ml y conjugados de PC5- y PC8- 200 µg/ml (L36686-25)

Ensayos	2-8 ºC			TA		37 ºC	
	t = 0	4 semanas	3 meses	2 semanas	4 semanas	2 semanas	4 semanas
Aspecto	peb	peb	peb	peb	peb	peb	peb
pH	6,10	6,09	6,10	6,10	6,12	6,11	6,11
Concentración de rClfAm (µg/ml)	440	NA	420	400	394	410	396
Pureza de rClfAm (%)	98,5	ND	97,0	98,4	97,2	98,4	97,1
Antigenicidad de PC5-CRM_{197} (µg/ml)	183	180	182	183	181	171	187
de	179	178	187	179	188,2	178	185
Humedad (%)	0,73 ± 0,13	6,05 ± 0,23	6,05 ± 0,07	ND	0,57 ± 0,07	ND	1,40 ± 0,25
[a] torta de color blanco y esponjosa							

Tabla 21: Estabilidad del tri-antígeno formulado a rClfA*m* 100 µg/ml y conjugados de PC5- y PC8- 50 µg/ml (L36686-3-2)

Ensayos	2-8 ºC			TA		37 ºC	
	t = 0	4 semanas	3 meses	2 semanas	4 semanas	2 semanas	4 semanas
Aspecto	peb	peb	peb	peb	peb	peb	peb
pH	5,96	5,93	5,97	5,93	5,93	5,93	5,92
Concentración de rClfAm (µg/ml)	110	100	110	110	100	110	110
Pureza de rClfAm (%)	95,5	95,2	95,5	95,3	95,2	95,3	95,2
Antigenicidad de PC5-CRM_{197} (µg/ml)	49	48	50	48	52	47	53
Antigenicidad de PC8-CRM_{197} (µg/ml)	47	51	46	47	53	50	53
Humedad (%)	0,37 ± 0,17	0,73 ± 0,15		NA	6,05 ± 0,07	ND	0,83 ± 0,01
[a] torta de color blanco y esponjosa							

Tabla 22: Estabilidad del tri-antígeno formulado a rClfA*m* 100 µg/ml y conjugados de PC5- y PC8- 50 µg/ml (L36051-195-2)

Ensayos	2-8 ºC			TA		37 ºC	
	t = 0	4 semanas	3 meses	2 semanas	4 semanas	2 semanas	4 semanas
Aspecto	peb	peb	peb	peb	peb	peb	peb
pH	5,93	5,91	5,93	5,98	5,92	5,94	5,92
Concentración de rClfAm (µg/ml)	100	100	110	110	100	110	100
Pureza de rClfAm (%)	ND	95,1	95,5	95,3	95,2	95,3	94,9
Antigenicidad de PC5-CRM_{197} (µg/ml)	38,1	39,8	37,6	NA	39,5	39,8	40
Antigenicidad de PC8-CRM_{197} (µg/ml)	37,2	34,9	37	NA	37,3	36	36,9
Humedad (%)	0,48 ± 0,06	0,32 ± 0,04	0,98 ± 0,12	NA	0,66 ± 0,09	NA	0,82 ± 0,12
[a] torta de color blanco y esponjosa							

También se realizaron ensayos de estabilidad a corto plazo. Se reconstituyeron formulaciones de tri-antígeno liofilizadas con diluyente NaCl 60 mM y se incubaron a temperatura ambiente durante diversos momentos, analizándose los puntos temporales t = 0, 4 horas y 24 horas para determinar la fuerza y pureza de rClfAm y la fuerza de PC5-CRM_{917}/PC8-CRM_{197} (Tablas 23-25). Se examinaron formulaciones de dosis alta (rClfAm 400 µg/ml, PC5-CRM_{197} 200 µg/ml y PC8-CRM_{197} 200 µg/ml) y de dosis bajas (rClfAm 200 µg/ml, PC5-CRM_{197} y PC8-CRM_{197} 50 µg/ml). Ambas dosis muestran una estabilidad de los componentes a las 24 horas a temperatura ambiente (después de la reconstitución) como se ve en la Figura 10.

Tabla 23: Estabilidad a corto plazo de tri-antígeno formulado a rClfAm 400 µg/ml, conjugados PC5-CRM_{197} y PC8-CRM_{197} 200 µg/ml (L36686-25)

	T = 0	T = 4 horas	T = 24 horas
Concentración de rClfAm (µg/ml)	420	410	440
Pureza de rClfA (%)	98,4	98,5	98,4
Concentración de PC5-CRM_{197} (µg/ml)	171	176	163
Concentración de PC8-CRM_{197} (µg/ml)	180	163	170

Tabla 24: Estabilidad a corto plazo de tri-antígeno formulado a rClfAm 400 µg/ml, conjugados PC5-CRM_{197} y PC8-CRM_{197} 200 µg/ml (L36686-3-1)

	T = 0	T = 4 horas	T = 24 horas
Concentración de rClfAm (µg/ml)	380	380	380
Pureza de rClfA (%)	97,7	97,8	98,2
Concentración de PC5-CRM_{197} (µg/ml)	186	176	176
Concentración de PC8-CRM_{197} (µg/ml)	172	150	160

Tabla 25: Estabilidad a corto plazo de tri-antígeno formulado a rClfAm 100 µg/ml, conjugados PC5-CRM_{197} y PC8-CRM_{197} 50 µg/ml (L36686-3-2)

	T = 0	T = 4 horas	T = 24 horas
Concentración de rClfAm (µg/ml)	160	107	113
Pureza de rClfA (%)	94,6	95,1	95,4
Concentración de PC5-CRM_{197} (µg/ml)	51	51	48
Concentración de PC8-CRM_{197} (µg/ml)	49	49	43

También se realizaron estudios de congelación-descongelación. El medicamento de tri-antígeno de dosis alta (rClfAm 400 µg/ml, PC5-CRM_{197} 200 µg/ml y PC8-CRM_{197} 200 µg/ml) se sometió a tres ciclos de congelación-descongelación y se analizó para determinar la fuerza y la pureza de rClfAm y la fuerza de PC5-CRM_{917}/PC8-CRM_{917}. No se observó prácticamente ningún cambio en la concentración para cada componente, lo que señala que los componentes activos del medicamento son estables durante los tres ciclos (Figura 11, Tabla 26).

Tabla 26: Sumario de datos de congelación-descongelación de L36686-25

	Congelación-descongelación 1 vez	Congelación-descongelación 2 veces	Congelación-descongelación 3 veces
Concentración de rClfAm (µg/ml)	160	107	113
Pureza de rClfA (%)	94,6	95,1	95,4
Concentración de PC5-CRM_{197} (µg/ml)	51	51	48
Concentración de PC8-CRM_{197} (µg/ml)	49	49	43

Ejemplo 16: medicamento de clfa/pc5/pc8/mntc (tetra-antígeno): caracterización de ClfA

La estabilización exitosa de ClfA en la formulación de tri-antígeno condujo al desarrollo de formulaciones que comprenden además una proteína MntC de *S. aureus*. Además, el factor aglutinante A se actualiza desde una versión marcada con T7 (rClfAm) a una sin el marcador (rmClfA). PC5- y PC8-CRM_{197} siguen siendo los mismos en términos de la proteína transportadora y la unidad de sacárido de repetición.

Debido a diversos cambios en los componentes de medicamento, se tomó un enfoque sistemático y racional para formular un medicamento nuevo que fuera compatible con los cuatro componentes activos. Las actividades incluyeron la caracterización de preformulación de antígenos, el desarrollo de racionales para los componentes de la formulación, la demostración de la estabilidad y la robustez del medicamento formulado y el desarrollo de un procedimiento de formulación. Los estudios se diseñaron en torno a las siguientes dosis:

1. 400/400/200/200 µg/ml de r*m*:ClfA/MntC/PC5-CRM_{197}/PC8-CRM_{197} y
2. 200/200/100/100 µg/ml de r*m*ClfA/MntC/PC5-CRM_{197}/PC8-CRM_{917}.

La caracterización biofísica utilizando múltiples procedimientos ortogonales (dicroísmo circular, fluorescencia, calorimetría diferencial de barrido capilar y DO_{350}) se realizó en dos lotes de rClfA*m* (L40184-77 y L40256-26; matriz: succinato 10 mM pH 6,0, NaCl 20 mM) y dos lotes de r*m*ClfA (L40227-36 y L40256-28; matriz: histidina 10 mM pH 6,5). Los datos resultantes mostraron 1) comparabilidad entre rClfAm y rmClfA, 2) coherencia lote a lote dentro de cada construcción de rClfA y 3) proporcionan un marco para un intervalo de pH de trabajo en adelante.

Se utilizó el dicroísmo circular (DC) como herramienta para comparar los diferentes lotes de rClfA a pH 6,0 y 7,0 (Figura 12). Las exploraciones de DC a ambos pH demostraron que todos los lotes probados de rClfAm y rmClfA tienen estructuras secundarias similares basadas en las superposiciones de los espectros. Además, se realizó un punto de fusión por DC de proteínas para comparar la termoestabilidad de los lotes en función del pH. Los

resultados observados en la Figura 13 indican que todos los lotes son comparables en el marco de la estructura secundaria. Los resultados también señalan que un pH de 5,0-7,0 es el intervalo de formulación óptima basado en este procedimiento.

Se utilizó fluorescencia de triptófano intrínseca para obtener información acerca de la estructura terciaria de rClfAm y rmClfA. Se sometieron lotes de ambas proteínas al punto de fusión por fluorescencia en función del pH para evaluar la termoestabilidad. Es importante señalar que rClfA posee dos triptófanos que se encuentran en el mismo dominio N3 de la proteína; por tanto, los datos suministrados por este procedimiento se localizan en esta región. La Figura 14A muestra que todos los lotes sometidos a ensayo de rClfA poseían termoestabilidades comparables, señalando que las estructuras también fueron similares. También se realizaron puntos de fusión de fluorescencia extrínseca en múltiples lotes de rClfA utilizando un colorante hidrófobo, sulfonato de 8-anilino-1-naftaleno (ANS). A medida que la estructura de la proteína se despliega al aumentar la temperatura, ANS se une a los parches hidrófobos recién expuestos de la proteína, aumentando en intensidad de emisión. En la Figura 14B, las temperaturas de fusión en base a la señal de ANS son similares en función del pH para todos los lotes de proteínas sometidas a ensayo. Los datos de CDB confirmaron que las temperaturas de fusión de todos los lotes sometidos a ensayo de rClfA fueron similares en función del pH (Figura 15) y que el pH 5-7 es un buen intervalo en adelante. También se utilizó DO_{350} para controlar la agregación como funciones de la temperatura y el pH (Figura 16). Los puntos de fusión de rmClfA lote L40256-29 (matriz: histidina 10 mM pH 6,5) en función del pH demostró que el único acontecimiento de agregación detectado por este procedimiento fue a pH 4,0.

Se utilizaron dos lotes de sustancias farmacológicas (L40256-28, L40256-29) para evaluar la estabilidad líquida de rmClfA en histidina, en lugar de succinato, en función del pH. Las formulaciones consistían en rmClfA 400 µg/ml, histidina 10 mM (intervalo de pH de 5,5 a 7,5), sacarosa al 4,5 % y polisorbato 80 al 0,01 %. Dos formulaciones adicionales consistían en succinato 10 mM, pH 6,5 como una comparación con histidina pH 6,5, y fosfato 10 mM, pH 8,0 como una examinación de alto pH (ambas formulaciones contenían también sacarosa al 4,5 % y PS80 al 0,01 %). Se utilizó HPLC por exclusión de tamaños para controlar la escisión de rmClfA durante seis semanas a 25 ºC. Los resultados indicaron que la histidina pH ~ 6,5 presentó la velocidad de degradación más lenta en ambos lotes -28 y -29 (Figura 17A). Esta velocidad coincidió con la de las formulaciones de succinato pH 6,6, lo que indica que la histidina era compatible con rmClfA como succinato. Por otra parte, el pH para todas las formulaciones se mantuvo estable y ninguna agregación fue detectable por DO_{350} durante todo el estudio (Figura 17B).

Ejemplo 17: medicamento de tetra-antígeno: caracterización DE MntC

A diferencia de ClfA, que es propensa a la degradación por hidrólisis, MntC se degrada por desamidación. Por tanto, era importante para determinar la estabilidad de MntC en un intervalo de pH. Los experimentos de fluorescencia de triptófano intrínseca realizados con MntC indicaron que se estaban produciendo dos acontecimientos importantes, con T_f1 a 40-55 ºC y T_f2 a 65-75 ºC (Figura 18). Siguiendo T_f1, el pH 5,0 y 6,0 fue más alto seguido de un pH de 7,0. Los datos indicaron un intervalo de pH de trabajo de 5,0 a 7,0. También se realizó una CDB con un lote representativo de MntC. Los termogramas representativos ilustran dos eventos térmicos principales, que pueden desenrollarse adicionalmente (Figura 19). Siguiendo la primera temperatura de fusión (T_f1), es evidente que el pH 5,0 y 6,0 tienen la termoestabilidad más alta seguidos de pH 7,0 (Figura 19). De acuerdo con los resultados de fluorescencia, estos datos señalan un intervalo de pH de trabajo de 5,0 a 7,0. Los datos de DO_{350} apoyan estas observaciones asimismo (Figura 20). El análisis de desamidación por II-HPLC confirmó que el pH alto y la temperatura alta aumentaron la velocidad de desamidación de MntC.

Ejemplo 18: Medicamento de tetra-antígeno: desarrollo de la formulación (tampón)

En las formulaciones de tri-antígeno descritas anteriormente, se proporcionaron las sustancias farmacológicas de conjugados de PC5 y PC8 en succinato a pH 7,0. El sistema de tampón de succinato, sin embargo, no ofrece una buena capacidad de tampón a valores de pH más bajos. Por tanto, los experimentos se realizaron con conjugados de PC5 y PC8 reformulados en histidina 10 mM a pH 6,7. Debido a que las sustancias farmacológicas conjugadas no filtran bien a pH < 6,5, dando como resultado la filtración lenta y una pérdida de la proteína conjugada, se prefiere un pH superior a 6,5. Esto se convirtió en la fuerza motriz para evaluar rmClfA, MntC y las formulaciones de medicamento en histidina para la uniformidad.

A partir de los estudios de caracterización de preformulación, se determinó que un intervalo de trabajo de pH tanto para rmClfA como para MntC era 5-7. El cambio de la matriz de DF de conjugado a histidina necesitó la evaluación de este sistema de tampón en el medicamento. Las velocidades de degradación de los antígenos se evaluaron como una formulación de tetra-antígeno en función del tiempo para establecer un óptimo pH de la formulación. Se realizaron experimentos de agitación para determinar la necesidad de un agente tensioactivo en la formulación. Pensando en la liofilización, se evaluaron los estabilizadores y agentes de carga para determinar la compatibilidad con los antígenos.

Se prepararon formulaciones de tetra-antígeno de alta dosis que consistían en 400/400/200/200 µg/ml de rmClfA/MntC/PC5-CRM_{197}/PC8-CRM_{197} en función del pH en el tampón de histidina. Se utilizó FI-HPLC para detectar la degradación de la proteína rmClfA y se utilizó II-HPLC para detectar la desamidación de MntC. La Figura 21 ilustra cromatogramas representativos de las dos proteínas y la forma en que se controlaron para determinar las

especies degradadas. Para rmClfA, los fragmentos de proteína escindidos se manifestaron a la derecha del pico principal de proteína, mientras que para MntC, el pico desamidado pudo encontrarse a la izquierda del pico principal. Ambas proteínas se muestran en la Figura 21 degradándose con el tiempo a 25 ºC.

Las estabilidades de las formulaciones se controlaron durante 0, 1 y 2 semanas a 2-8 ºC y 0, 3 y 7 días a 25 ºC. A 25 ºC, rmClfA demostró que el aumento de pH disminuyó la velocidad de escisión de la proteína (Figuras 22A y B). Por el contrario, el aumento de pH disminuyó la velocidad de desamidación de MntC (Figuras 22C y D). Ambos mecanismos se suprimen significativamente a 2-8 ºC, aunque la tendencia dependiente del pH se mantuvo constante.

Los antigenicidades de los conjugados PC5- y PC8-CRM_{197} se controlaron a diferentes pH a 2-8 ºC y 25 ºC por medio de nefelometría. A 2-8 ºC, ambos conjugados mantuvieron la antigenicidad durante 2 semanas para el experimento (Figuras 23A y B). A 25 ºC, PC5-CRM_{197} no mostró ningún cambio después de una semana, sin embargo, PC8-CRM_{197} mostró aproximadamente una disminución del 18 % en la antigenicidad a pH 5,5 (Figuras 23C y D).

Ejemplo 19: medicamento de tetra-antígeno: desarrollo de la formulación (agente de carga)

Se sometieron a ensayo formulaciones que comprendían 400/400/200/200 µg/ml de rmClfA/MntC/PC5-CRM_{197}/PC8-CRM_{197} y que contenían sacarosa al 4,5 %, 2) trehalosa al 4,5 %, 3) manitol al 3 %/sacarosa al 1 %, 4) manitol al 3 %/trehalosa al 1 %, 5) glicina al 3 %/trehalosa al 1 %, 6) glicina al 3 %/trehalosa al 1 % y 7) sacarosa al 4,5 %, sin PS80, para determinar la estabilidad. Todas las formulaciones contenían histidina 10 mM y polisorbato 80 al 0,01 % (con la excepción de la formulación 7) con el pH medido de las formulaciones a 6,3. Se transfirieron alícuotas de las formulaciones a viales Schott de Tipo 1 de 2 ml con tapones con revestimiento de Flurotec 4432/50 y los viales se agitaron suavemente durante 6 días a temperatura ambiente.

Las mediciones de DO_{350} de todas las muestras después de la agitación no mostraron ningún aumento de especies agregadas (Figura 24B). Las mediciones de osmolalidad revelaron que las formulaciones que contenían glicina tenían valores que superaban la osmolalidad fisiológica de 290 mOsm (Figura 24A). Las recuperaciones fueron > 98 % para ClfA y MntC, > 95 % para PC5-CRM_{197} y > 93 % para PC8-CRM_{197}, estando todas bien dentro de las variabilidades del ensayo. El análisis por II-HPLC para controlar la desamidación de MntC mostró un aumento después de 6 días de agitación, pero todas las formulaciones mostraron velocidades similares, lo que indica que ningún excipiente o combinación de excipientes particular mejoró ni aceleró el procedimiento. Por último, el análisis por FI-HPLC de MntC y rmClfA no mostró cambios significativos en los perfiles cromatográficos.

Las muestras que contenían glicina se retiraron de la lista de candidatos de excipiente debido a la alta osmolaridad. La sacarosa, la trehalosa, el manitol y la glicina se evaluaron como productos liofilizados como se describe por las formulaciones en la Tabla 27. Las formulaciones se liofilizaron y cada una se sometió a ensayo para determinar la estabilidad a 2-8 ºC, 25 ºC, 37 ºC y 50 ºC. Los datos de FI-HPLC para dosis altas en la Figura 25A no mostraron ningún cambio después de un mes a 2-8 ºC, 25 ºC y 37 ºC. A 50 ºC, rmClfA mostró un aumento en el pico saliente delantero, presentando la formulación de manitol/sacarosa el mayor cambio. Además, el pico saliente de MntC aumentó en la formulación de manitol/sacarosa también. Para la dosis baja, se observó un cambio en ambos picos salientes delanteros de rmClfA, pero demostrando la formulación de manitol/sacarosa una vez más un mayor aumento (Figura 25B).

Tabla 27: Formulaciones

	rmClfA (µg/ml)	MntC (µg/ml)	CPS-CRM_{197} (µg/ml)	PC8-CRM_{197} (µg/ml)	Excipiente
L44130-15-1 (Alta)	400	400	200	200	sacarosa al 4,5 %
L44130-15-2 (Baja)	40	40	20	20	sacarosa al 4,5 % 3 %
L44130-15-3 (Alta)	400	400	200	200	sacarosa al 3 %
L44130-15-4 (Baja)	40	40	20	20	sacarosa
L44130-15-5 (Alta)	400	400	200	200	trehalosa al 4,5 %
parámetros constantes: histidina 10 mM, PS80 al 0,01 %, pH medido ~ 6,3					

También se utilizó II-HPLC para controlar la calidad de MntC. En la Figura 25C, las muestras de estabilidad 2-8 ºC de dosis alta no muestran ningún cambio en ninguna de las formulaciones después de un mes. Las muestras mantenidas a 25 ºC y 37 produjeron resultados similares (no se muestra). A 50 ºC, sin embargo, las dosis altas y bajas mostraron los mayores cambios en el perfil sobre la combinación de manitol/sacarosa. Los resultados de nefelometría para los conjugados de PC5 y PC8 no mostraron ningún cambio en las antigenicidades a ninguna temperatura después de un mes.

Estos experimentos son debidos a que la sacarosa era el excipiente candidato líder, las matrices de medicamentos se formularon con histidina 10 mM, pH 6,5 y PS80 al 0,01 % mantenido constante y variando las concentraciones de

sacarosa en un intervalo del 2,0-7,0 % y se liofilizaron. Las lecturas clave eran el tiempo de secado en la etapa de secado primaria, el aspecto y la humedad. Los resultados del ensayo indicaron que el intervalo de concentración de sacarosa del 3 al 6 % utilizado en formulaciones de tri-antígeno también era aceptable para una formulación de tetra-antígeno.

Ejemplo 20: medicamento de tetra-antígeno: desarrollo de la formulación (polisorbato 80)

Se diseñó un experimento de agitación 1) para determinar la necesidad de polisorbato 80 y 2) para verificar la robustez de la formulación. Como se describe en la tabla 28, las formulaciones monovalentes SA4ag se evaluaron con PS80 al 0, al 0,01 y al 0,03 %. Las muestras se dividieron en alícuotas en viales Schott de tipo 1 de 2 ml con tapones 4432/50 recubiertos con FluroTec y se agitaron durante 24 horas a TA con un agitador de formación de vórtice VWR (Modelo DVX-2500, 500 RPM modo de pulsos). Se colocaron controles no agitados a temperatura ambiente durante 24 horas en paralelo con las muestras agitadas. Se agruparon múltiples viales para cada formulación y se analizaron.

Tabla 28: Formulaciones para el experimento de agitación

	Polisorbato 80	Matriz de tampón	Concentraciones de sustancias activas
rmClfA monovalente	0, 0,01, 0,03 %	histidina 10 mM, pH 6,5, sacarosa al 4,5 %	400 µg/ml
MntC monovalente	0, 0,01, 0,03 %	histidina 10 mM, pH 6,5, sacarosa al 4,5 %	400 µg/ml
PC5-CRM_{197} monovalente	0, 0,01, 0,03 %	histidina 10 mM, pH 6,5, sacarosa al 4,5 %	400 µg/ml
PC8-CRM monovalente	0, 0,01, 0,03 %	histidina 10 mM, pH 6,5, sacarosa al 4,5 %	400 µg/ml
Tetra-antígeno	0, 0,01, 0,03 %	histidina 10 mM, pH 6,5, sacarosa al 4,5 %	400/400/200/200 µg/ml de r*m*ClfA/MntC/PC5-CRM_{197}/PC8-CRM_{197}

Las concentraciones de los antígenos se examinaron para la recuperación después de la agitación. Los datos posteriores a la agitación de los cuatro antígenos no indican ningún cambio en las concentraciones, no demostraron ninguna pérdida de ninguna de las muestras, incluyendo las formulaciones que no contenían PS80 (Figuras 26A y B). El análisis de pureza de rmClfA y MntC por FI-HPLC no reveló ningún cambio en ninguna de las proteínas después de la agitación (Figura 26C). La pureza de MntC utilizando II-HPLC demostró una disminución similar (debido a la desamidación) en las formulaciones monovalentes cuando se comparan los niveles de PS80 (Figura 26D). Una observación interesante de los datos de pureza por II-HPLC de MntC es que, como formulación monovalente, la velocidad de degradación (correspondiente a la desamidación) es significativa en comparación a la MntC en la formulación de tetra-antígeno. Dado que todas las formulaciones compartían la misma matriz de tampón, es posible que MntC interactuase con otro antígeno que ralentizase la velocidad de desamidación de la proteína. Los valores de pH de las formulaciones también se mantuvieron constantes (Figura 26E) y las mediciones de DO_{350} no revelaron ningún aumento de la agregación después de la agitación (Figura 26F).

Ejemplo 21: medicamento de tetra-antígeno: liofilización

Se utilizó un calorímetro diferencial de barrido modulado (MCDB) de TA Instruments para obtener transiciones vítreas para las formulaciones líquidas antes de la liofilización y los valores de T_v' se presentan en la Tabla 29. Los lotes L44130-39-1 y 39-2 representan formulaciones objetivo de alta y baja dosis que contenían sacarosa al 4,5 %. Las muestras del lote L44130-45 abarcaban la concentración de sacarosa objetivo y contenían el 3 % o el 6 % del excipiente. Estas muestras contenían concentraciones de ClfA/PC5-CRM_{917}/PC8-CRM_{917}/MntC que abarcaban las dosis altas y bajas (+ 30 % y -30 %) de L44130-39-1. Todas las formulaciones proporcionaron valores de T_v' de -33 a -35 ºC, que es típico de la sacarosa como se notifica en la bibliografía.

Tabla 29: Mediciones de Tv' de formulaciones

Formulación	Tv' (ºC)
dosis alta de L44130-39-1	-34,5
dosis baja de L44130-39-1	-34,5
L44130-45-1	-33,8
L44130-45-2	-35,5
L44130-45-3	-34,7
L44130-45-	-34,4

Los valores de T_v de muestras liofilizadas se presentan en la Tabla 30. Las muestras se abrieron, se transfirieron y se sellaron en recipientes herméticos de aluminio de CDB en una caja de guantes seca para evitar que las tortas liofilizadas acumularan humedad de la atmósfera. Los valores medidos estaban en el intervalo de 65-70 ºC, que es típico de una formulación de sacarosa.

Tabla 30: Mediciones de Tv' de formulaciones liofilizadas

	Tv (ºC)
dosis alta de L44130-39-1	65,6
dosis baja de L44130-39-1	67,1
L44130-45-1	69,0
L44130-45-2	65,6
L44130-45-3	69,2
L44130-45-4	69,5

El ciclo de liofilización se basó en el ciclo utilizado para el medicamento SA3ag, ya que las dos formulaciones eran similares, utilizando ambas sacarosa como agente de carga. La Tabla 31 define los intervalos para los ciclos de liofilización utilizados para la producción de formulaciones de tetra-antígeno.

Tabla 31: Parámetros del ciclo de liofilización

	Temperatura de almacenamiento (ºC)	Velocidad/Retención	Tiempo (min)	Presión (mTorr)
Congelación	-50	0,3 ºC/min	-200	atmosférica
	-50	Retención	60-120	
	-10	0,3 ºC/min	~ 140	
Recocido	-10	Retención	120-300	
	-50	0,3 ºC/min	-140	
	-50	Retención	~180	
Secado primario	-50	Retención	-30	50 (6,65 Pa)
	-30	0,2 ºC/min	~ 100	50 (6,65 Pa)
	-30	Retención	1900-2600	50 (6,65 Pa)
Secado secundario	30	0,2 ºC/min	-300	50 (6,65 Pa)
	30	Retención	700-900	200 (26,60 Pa)
	5	0,5 ºC/min	~ 50	200 (26,60 Pa)
	5	Retención	hasta tapar	200 (26,60 Pa)

Se realizaron estudios de liofilización comparando los siguientes parámetros:

1. Sacarosa al 4,5 % frente a manitol al 4 %/sacarosa al 1 % y
2. Ciclo de liofilización conservadora frente a ciclo rápido, agresivo.

Las muestras se evaluaron tanto como formulaciones de medicamentos monovalentes, así como una formulación de tetra-antígeno. Todas las formulaciones incluyeron histidina 10 mM, pH 6,5, y PS80 al 0,01 %. Las dosis fueron de 400 µg/ml para rmClfA y MntC y de 200 µg/ml para los conjugados de PC5- y PC8-CRM_{917}. Las formulaciones liofilizadas antes y después de la liofilización se compararon mediante los siguientes ensayos: aspecto, pH, IC-HPLC para la desamidación de MntC, FI-HPLC para la pureza de rmClfA y MntC, nefelometría para la recuperación de conjugado, la humedad, DO_{350} para la detección de precipitados y la calorimetría diferencial de barrido (CDB) para la evaluación estructural. Los ciclos utilizados se describen en la Tabla 32 y la Tabla 33.

Tabla 32: Parámetros de ciclo de liofilización (ciclo lento)

	Temperatura de almacenamiento (ºC)	Velocidad/Retención	Tiempo (min)	Presión (mTorr)
Congelación	-50	0,3 ºC/min	183,3	atmosférica
	-50	Retención	60	
	-10	0,3 ºC/min	133,3	
Recocido	-10	Retención	120	
	-50	0,3 ºC/min	133,3	
	-50	Retención	180	

(continuación)

	Temperatura de almacenamiento (ºC)	Velocidad/Retención	Tiempo (min)	Presión (mTorr)
Secado primario	-50	Retención	30	50 (6,65 Pa)
	-30	0,2 ºC/min	100	50 (6,65 Pa)
	-30	Retención	1920	50 (6,65 Pa)
Secado secundario	30	0,2 ºC/min	300	50 (6,65 Pa)
	30	Retención	720	200 (26,60 Pa)
	5	0,5 ºC/min	50	200 (26,60 Pa)
	5	Retención	Hasta tapar	200 (26,60 Pa)
tiempo de ejecución total: 66 horas				

Tabla 33: parámetros de ciclo de liofilización (ciclo rápido)

	Temperatura de almacenamiento (ºC)	Velocidad/Retención	Tiempo (min)	Presión (mTorr)
Congelación	-50	1 ºC/min	-50	atmosférica
	-50	Retención	60	
Recocido	-10	1 ºC/min	40	
	-10	Retención	120	
	-50	1 ºC/min	40	
	-50	Retención	180	
Secado primario	-50	Retención	30	50 (6,65 Pa)
	0	1 ºC/min	50	50 (6,65 Pa)
	0	Retención	1800	50 (6,65 Pa)
Secado secundario	40	0,5 ºC/min	80	50 (6,65 Pa)
	40	Retención	360	200 (26,60 Pa)
	5	1 ºC/min	25	200 (26,60 Pa)
	5	Retención	hasta tapar	200 (26,60 Pa)
tiempo de ejecución total: 47 horas				

Se describe el aspecto de las tortas en la Tabla 34. Todas las tortas que contenían manitol proporcionaron tortas visualmente elegantes con ambos ciclos. Las formulaciones de sacarosa mostraron tortas aceptables como se esperaba con el ciclo largo, pero con el ciclo corto agresivo, produjeron tortas parcialmente colapsadas. Los datos de contenido de humedad de las tortas revelaron que todas las formulaciones tenían <1 %, sin embargo, las muestras que contenían manitol en general, tenían una humedad más baja que la sacarosa sola. Las superposiciones de FI-HPLC en la Figura 27A no mostraron cambios en las purezas anteriores y posteriores a la liofilización de rmClfA y MntC y los resultados de nefelometría tampoco revelaron ningún cambio en antigenicidades para PC5-CRM_{197} (Figura 27B) y PC8-CRM_{197} (Figura 27C) después de la liofilización independientemente del ciclo o excipiente. Las Figuras 27D y E demuestran que las especies desamidadas de MntC se mantienen a ~ 2,5 % después de la liofilización para la formulación de tetra-antígeno. El pH permaneció igual después de la liofilización y no se detectó ningún aumento notable en la DO_{350} en las muestras después de la liofilización, lo que indica la ausencia de precipitados. Es importante tener en cuenta, sin embargo, que la DO_{350} no detectará la generación de agregados solubles pequeños. Los datos de CDB indicaron que no se promovieron perturbaciones estructurales en los antígenos (rmClfA y MntC) como resultado de ningún ciclo, como se evidencia por la falta de cambio en las temperaturas de fusión (Figura 27F). Los conjugados no se controlaron ya que no produjeron una señal de fusión fuerte. Finalmente, se compararon las % de potencias relativas *in vitro* de los antígenos antes y después de la liofilización utilizando un ensayo Luminex. Se sometió a ensayo rmClfA tanto en forma monovalente como en una formulación de tetra-antígeno, pero los conjugados solamente se sometieron a ensayo como formulaciones monovalentes porque la combinación de tetra-antígeno produjo interferencia. Los resultados mostraron que todas las muestras analizadas (manitol y sacarosa) se encontraban bien dentro del error de ensayo cuando se compararon antes y después de la liofilización (ciclos tanto lento como rápido) y que rmClfA (Figura 27G) y los conjugados (Figura 27H) estaban en condiciones estables.

Tabla 34: Aspecto de las tortas

Número de lote	Antígenos	Ciclo largo	Ciclo corto
Muestras liofilizadas que contenían sacarosa al 4,5 %			
L44137-79A L44137-79C L44137-79E L44137-79G L44137-791	rmClfA MntC PC5-CRM PC8-CRM Tetra-antígeno	Se observó que todas las muestras eran un polvo de color blanco secado por congelación con señales de ligera contracción	Se observó un colapso parcial de la torta (la torta era escasa o no densa en el medio). Se observó que todas las muestras eran un polvo de color blanco secado por congelación con señales de ligera contracción.
Muestras liofilizadas que contenían manitol al 4 %, sacarosa al 1 %			
L44137-79B L44137-79D L44137-79F L44137-79H L44137-79J	rmClfA MntC PC5-CRM PC8-CRM Tetra-antígeno	Se observó que todas las muestras eran un polvo de color blanco secado por congelación con aspecto de torta lisa.	

Ejemplo 22: medicamento de tetra-antígeno: reconstitución

Se eligió que el diluyente de reconstitución fuera NaCl 60 mM en agua para inyección (API). La Figura 28 demuestra que cuando se reconstituye con este diluyente, tanto las dosis altas (rmClfA/MntC/PC5-CRM197/PC8-CRM197 400/400/200/200 µg/ml) como las dosis bajas (rmClfA/MntC/PC5-CRM_{197}/PC8-CRM_{197} 200/200/100/100 µg/ml) muestran la osmolaridad en el intervalo fisiológico. El volumen de reconstitución elegido fue de 0,7 ml, dando como resultado un volumen final de 0,73 ml.

Después de la reconstitución con NaCl 60 mM, se realizaron los estudios de estabilidad a 2-8 ºC y 25 ºC durante 48 horas a las vacunas de tetra-antígeno de dosis alta y baja. Los datos en la Figura 29A muestran que la pureza de MntC como se detecta por FI-HPLC se mantuvo sin cambios durante 48 horas a 2-8 ºC y 25 ºC. rmClfA fue estable durante 48 horas a 2-8 ºC, pero a 25 ºC, la pureza se redujo en el punto temporal de 24 horas (Figura 29B). Se utilizó II-HPLC para controlar la pureza de MntC, para la que una disminución significó un aumento de la desamidación (Figura 29C). La proteína se mantuvo estable a 2-8 ºC con una disminución de la pureza nominal del < 2 %. A 25 ºC, MntC permaneció estable durante 4 horas, pero disminuyó significativamente en pureza (por debajo del 90 %) después de 24 horas. El análisis cinético de los datos mostró lo siguiente: degradación del 0,03 % y el 0,26 % por hora a 2-8 ºC y 25 ºC, respectivamente, para MntC (Figura 29D) y degradación del 0,01 % y el 0,16 % por hora a 2-8 ºC y 25 ºC, respectivamente, para rmClfA (Figura 29E). Los datos adicionales mostraron que las concentraciones de los antígenos no cambiaron a ninguna temperatura después de 48 horas (Figuras 30A-D). También el pH se mantuvo igual durante 48 horas (Figura 30E).

La vacuna después de la reconstitución fue estable durante cuatro horas a temperatura ambiente y hasta veinte cuatro horas a 2-8 ºC sobre la base del análisis de la vacuna después de la reconstitución para los cuatro antígenos.

Ejemplo 23: medicamento de tetra-antígeno: recuperación después de la liofilización

La recuperación después del procedimiento de liofilización de las formulaciones de tetra-antígeno se evaluó con dos conjuntos de estudios (dos de dosis altas y dos de dosis bajas), en los que el procedimiento consistió en la formulación, la filtración, la carga y liofilización. Las Figuras 31A y B muestran que no hubo pérdida de ningún antígeno después de la liofilización. Análogamente, las Figuras 31C y D muestran que no hubo ningún cambio en la pureza de rmClfA o MntC en las muestras después de la liofilización.

Ejemplo 24: medicamento de tetra-antígeno: estabilidad de la formulación

Se sometieron a ensayo formulaciones de tetra-antígeno con:

1. 400/400/200/200 µg/ml de rmClfA/MntC/PC5-CRM_{197}/PC8-CRM197,
2. 200/200/100/100 µg/ml de rmClfA/MntC/PC5-CRM_{197}/PC8-CRM_{197} o
3. 40/40/20/20 µg/ml de rmClfA/MntC/PC5-CRM_{197}/PC8-CRM_{197}

para determinar la estabilidad a 2-8 ºC, 25 ºC y 37 ºC. Las formulaciones (1) y (2) se mantuvieron estables en las tres temperaturas durante seis meses. La formulación (3) demostró 5 meses de estabilidad a 2-8 ºC (Tabla 35). Las sustancias farmacológicas utilizadas para este estudio fueron L40256-30 para rmClfA (lote representativo de tetra-antígeno), L44124-64 para MntC (lote representativo de tetra-antígeno), 7PC5C-1002 para PC5-CRM_{197} (lote representativo de tri-antígeno) y G-C8-3-9 para PC8-CRM_{197} (lote representativo de tri-antígeno).

Tabla 35: Estabilidad a 5 meses de Formulación de Tetra-antígeno (3)

	t = 0	2-8 ºC, 5 meses
Aspecto	Torta esponjosa de color blanco	Torta esponjosa de color blanco
Tiempo de Reconstitución	< 30 segundos	< 30 segundos
pH	6,5	6,5
Humedad (%)	0,64	0,77
Fuerza rmClfA (µg/ml) por II	38	36
Fuerza de MntC (µg/ml) por II	35	40
Fuerza de PC5 (µg/ml) por nefelometría	24	24
Fuerza de PC8 (µg/ml) por Nefelometría	25	25
Pureza (%) por II	96,1	96,3
MntC desamidación (%) por IEX	1,7	2,2
Pureza (%) de rmClfA por FI-HPLC	97,1	97,5
Pureza (%) de MntC por FI-HPLC	97,2	97,4

Tabla 36 describe los lotes de formulaciones liofilizadas de tetra-antígeno utilizadas para estudiar la estabilidad.

Tabla 36: Descripción de formulaciones utilizadas para estudios de estabilidad

	Concentraciones de sustancias activas				**N.º de lote de SF a granel**			
	rmClfA	MntC	PC5-CRM$_{197}$	PC8-CRM$_{197}$	rmClfA	MntC	PC5-CRM$_{197}$	PC8-CRM$_{197}$
L44130-39-1	400	400	200	200	L40256-30	L44124- 64	L40241-84	L43364-13
L44130-39-2	200	200	100	100	L40256-30	L44124-64	L40241-84	L43364-13
L44130-71-1	400	400	200	200	L40256-53	L44124-64	L43365-75	L43342-177
L44130-71-2	200	200	100	100	L40256-53	L44124-64	L43365-75	L43342-177
L44130-88-1	400	400	200	200	L40256-53	L44124-64	L43365-75	L43342-177
L44130-88-2	200	200	100	100	L40256-53	L44124-64	L43365-75	L43342-177
L44130-100	400	400	200	200	L40256-53	L44124-64	L43365-75	L43342-177

Todas las formulaciones contenían histidina 10 mM, pH 6,5, sacarosa al 4,5 %, polisorbato 80 al 0,01 %
Las sustancias farmacológicas se proporcionaron en las siguientes matrices:
rmClfA: histidina 10 mM, pH 6,5
MntC: histidina 10 mM, pH 6,0
conjugados PC5- y PC8-CRM$_{197}$: histidina 10 mM, pH 6,7

Tabla 37 y la Tabla 38 muestran sumarios de datos de estabilidad de 6 meses para las dosis altas y bajas, respectivamente. Después de seis meses, ambas dosis mantuvieron el mismo aspecto de la torta, se reconstituyeron rápidamente con el diluyente, el pH se mantuvo 6,05 ± 0,3 y la humedad se conservó a < 1,5 %. Las fuerzas de rmClfA, MntC, PC5-CRM$_{197}$ y PC8-CRM$_{197}$ no cambiaron. Además, los valores de pureza de rmClfA y MntC se mantuvieron con respecto a t = 0. Se demuestra que las formulaciones de tetra-antígeno de dosis alta y baja son estables en condiciones de almacenamiento a largo plazo y aceleradas durante tres meses. De forma similar, un segundo conjunto de formulaciones en los dos niveles de dosis demostró estabilidad a 2-8 ºC, 25 ºC y 37 ºC durante seis meses (Tabla 39 y Tabla 40). Basado en los datos, el período de validez propuesto para estas muestras es de 12 meses.

Tabla 37: Sumario de estabilidad a 6 meses de formulación liofilizada de dosis alta de Tetra-antígeno (L44130-39-1)										
	T = 0	**2-8 °C, 1 mes**	**25 °C, 1 mes**	**37 °C, 1 mes**	**2-8 °C, 3 meses**	**25 °C, 3 meses**	**37 °C, 3 meses**	**2-8 °C, 6 meses**	**25 °C, 6 meses**	**37 °C, 6 meses**
Aspecto	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa
Tiempo de reconstitución	< 30 segundos	< 30 segundos	< 30 segundos	< 30 segundos	< 30 segundos	< 30 segundos	< 30 segundos	< 30 segundos	< 30 segundos	< 30 segundos
pH	6,7	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,5	6,6	6,6	6,6
Humedad	0,79	0,84	1,1	1,26	0,99	1,41	1,45	1,02	1,33	1,38
Fuerza de rmClfA (µg/ml) por II	360	370	370	370	350	350	350	370	370	370
Fuerza de MntC (µg/ml) por II	370	360	360	360	360	360	360	380	380	380
Fuerza de PC5 (µg/ml) por nefelometría	204	199	195	194	199	197	199	212	209	207
Fuerza de PC8 (µg/ml) por nefelometría	198	197	209	211	213	211	206	198	201	202
Pureza (%) por II	95,9	96,3	96,3	96,2	96,4	96,5	96,4	96,1	95,9	96,0
Desamidación de MntC (%) por II	2,9	2,6	2,6	2,6	2,6	2,5	2,5	2,7	2,8	2,7
Pureza de rmClfA (%) por FI-HPLC	98,5	98,7	98,8	98,7	98,2	98,0	97,9	98,3	98,2	97,8
Pureza de MntC (%) por FI-HPLC	98,7	98,4	98,4	98,3	98,5	98,2	98,3	98,1	98,1	97,9

Tabla 38: Sumario de estabilidad a 6 meses de formulación liofilizada de baja dosis de Tetra-antígeno (L44130-39-2)										
	T = 0	**2-8 ºC, 1 mes.**	**25 ºC, 1 mes.**	**37 ºC, 1 mes.**	**2-8 ºC, 3 meses.**	**25 ºC, 3 meses**	**37 ºC, 3 meses.**	**2-8 ºC, 6 meses.**	**25 ºC, 6 meses.**	**37 ºC, 6 meses.**
Aspecto	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa
Tiempo de reconstitución	< 30	< 30	< 30	< 30	< 30	< 30	< 30	< 30	< 30	< 30
pH	6,6	6,6	6,7	6,7	6,5	6,5	6,5	6,6	6,6	6,6
Humedad	0,75	0,74	0,92	0,98	0,80	1,06	1,07	0,96	1,15	1,06
Fuerza de rmClfA (µg/ml) por II	180	190	190	190	170	170	170	190	190	190
Fuerza de MntC (µg/ml) por II	180	180	180	180	180	180	180	190	190	190
Fuerza de PC5 (µg/ml) por nefelometría	97	97	95	95	99	100	99	106	104	102
Fuerza de PC8 (µg/ml) por nefelometría	101	100	100	98	107	109	101	104	104	102
Pureza (%) por II	95,7	96	96	96,1	96,3	96,4	96,3	96,2	96,1	96,0
Desamidación de MntC (%) por II	3	2,8	2,8	2,7	2,6	2,5	2,5	2,6	2,6	2,7
Pureza de rmClfA (%) por FI-HPLC	98,5	98,6	98,7	98,5	97,9	97,7	97,8	98,0	97,6	98,1
Pureza de MntC (%) por FI-HPLC	98,7	98,4	98,4	98,4	98,2	97,8	98,0	98,1	98,0	97,7

Tabla 39: Sumario de estabilidad a 6 meses de formulación liofilizada de dosis alta de Tetra-antígeno (L44130-71-1)										
	t = 0	**2-8 °C, 1 mes**	**25 °C, 1 mes**	**37 °C, 1 mes**	**2-8 °C, 3 meses**	**25 °C, 3 meses**	**37 °C, 3 meses**	**2-8 °C, 6 meses**	**25 °C, 6 meses**	**37 °C, 6 meses**
Aspecto	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa
Tiempo de reconstitución	< 30	< 30	< 30	< 30	< 30	< 30	< 30	< 30	< 30	< 30
pH	NA	6,4	6,4	6,2	6,3	6,2	6,2	6,4	6,4	6,4
Humedad	0,57	0,56	0,60	0,58	0,57	0,56	0,58	0,59	0,62	0,61
Fuerza de rmClfA (µg/ml) por II	440	440	440	450	450	450	450	420	430	430
Fuerza de MntC (µg/ml) por II	400	390	390	390	400	410	400	400	410	400
Fuerza de PC5 (µg/ml) por nefelometría	189	187	196	193	181	192	187	179	197	190
Fuerza de PC8 (µg/ml) por nefelometría	203	200	189	195	188	201	193	220	216	215
Pureza (%) por II	95,9	96,1	96,2	96,2	95,9	96,0	96,2	95,8	96,0	96,0
Desamidación de MntC (%) por II	2,9	2,7	2,6	2,7	2,9	2,9	2,7	3,0	2,8	2,7
Pureza de rmClfA (%) por FI-HPLC	99,0	98,9	98,8	98,8	99,0	98,9	99,0	99,0	99,0	98,9
Pureza de MntC (%) por FI-HPLC	98,2	98,1	98,2	98,2	97,9	97,9	98,3	98,5	98,4	98,2

Tabla 40: Sumario de estabilidad a 6 meses de formulación liofilizada de dosis baja de Tetra-antígeno (L44130- 71-2)										
	t = 0	**2-8 °C, 1 mes**	**25 °C, 1 mes**	**37 °C, 1 mes**	**2-8 °C, 3 meses**	**25 °C, 3 meses**	**37 °C, 3 meses**	**2-8 °C, 6 meses**	**25 °C, 6 meses**	**37 °C, 6 meses**
Aspecto	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa
Tiempo de reconstitución	< 30	< 30	< 30	< 30	< 30	< 30	< 30	< 30	< 30	< 30
pH	NA	6,3	6,3	6,2	6,3	6,3	6,3	6,4	6,2	6,2
Humedad	0,61	0,62	0,61	0,60	0,64	0,56	0,64	0,65	0,64	0,68
Fuerza de rmClfA (µg/ml) por II	220	220	220	220	230	230	230	220	210	210
Fuerza de MntC (µg/ml) por II	190	190	190	190	200	200	200	190	200	200
Fuerza de PC5 (µg/ml) por nefelometría	94	99	94	95	96	96	88	102	103	97
Fuerza de PC8 (µg/ml) por nefelometría	94	100	98	98	99	99	93	114	114	114
Pureza (%) por II	95,8	96,3	96,3	96,2	95,9	96,2	96,2	96,1	96,3	96,2
Desamidación de MntC (%) por II	3,1	2,7	2,6	2,7	3,0	2,7	2,7	2,8	2,6	2,6
Pureza de rmClfA (%) por FI-HPLC	99,0	98,7	98,7	98,6	99,0	99,0	99,0	99,0	98,8	99,0
Pureza de MntC (%) por FI-HPLC	98,1	98,2	98,4	98,2	98	98,1	97,9	98,4	98,3	98,4

Seis meses de ensayo de estabilidad de una matriz del medicamento liofilizado a 2-8 ºC demostraron que todos los parámetros del ensayo seguían siendo los mismos durante la duración del estudio (Tabla 41). El período de validez propuesto de la matriz de fármaco es de 12 meses.

Tabla 41: Sumario de estabilidad a 6 meses de formulación liofilizada de matriz de fármaco de Tetra-antígeno (L44130-57-2)

	T = 0	2-8 ºC, 3 meses	25 ºC, 3 meses
Aspecto Tiempo de reconstitución	Torta blanca esponjosa < 30 segundos	Torta blanca esponjosa <30 segundos	Torta blanca esponjosa <30 segundos
pH	6,5	6,4	6,5
Humedad	0,66	0,78	0,78

Se reconstituyeron formulaciones liofilizadas de toxicología de tetra-antígeno de dosis alta (L44130-39-1) y dosis baja (L44130-39-2) con 0,7 ml de diluyente NaCl 60 mM y se sometieron a ensayo para determinar la estabilidad a 2-8 ºC y 25 ºC. Las muestras se analizaron a t = 0,4 y 24 horas. Los ensayos críticos fueron pH, pureza de rmClfA por FI-HPLC, pureza de MntC por II-HPLC y fuerzas de rmClfA y MntC por II-HPLC y antigenicidad de los conjugados PC5/PC8 por nefelometría. Los principales mecanismos de descomposición que se monitorizaron fueron la escisión de la proteína de rmClfA y la desamidación de MntC. En las Figuras 32A y B, las purezas de las dos proteínas recombinantes se mantienen a 2-8 ºC durante 24 horas para ambas dosis. A la incubación a 25 ºC, las purezas de las dos proteínas se mantuvieron sin cambios a las 4 horas, pero disminuyeron a las 24 horas. Las fuerzas de las proteínas (Figuras 32C y D) y los conjugados (Figuras 32E y F) y el pH (Figura 32G) también eran constantes después de 24 horas a 2-8 y 25 ºC. En resumen, las formulaciones para los cuatro antígenos fueron estables después de la reconstitución durante cuatro horas a temperatura ambiente y hasta veinticuatro horas a 2-8 ºC basado en el análisis de las formulaciones después de la reconstitución.

Ejemplo 25: medicamento de tetra-antígeno: estudios de límites

Se diseñó un estudio de límite para acotar los componentes de formulaciones de dosis alta y baja para demostrar la robustez de la formulación. La Tabla 42 detalla las formulaciones. Los componentes activos se variaron en un 30 % más altos que la dosis alta (400/400/200/200 µg/ml de rmClfA/MntC/PC5-CRM_{197}/PC8-CRM_{197}) y un 30 % inferior a la dosis baja (200/200/100/100 µg/ml de rmClfA/MntC/PC5-CRM_{917}/PC8-CRM_{197}). Los inactivos se variaron en los intervalos de 6,0–7,0 para el pH, 5-15 mM para la histidina, 3-6 % para la sacarosa y 0,005-0,015 % para PS80.

Tabla 42: Diseño del estudio de límite

Descripción	rmClfA WML)	MntC (µg/ml)	PC5-CRM (µg/ml)	PC8-CRM (µg/ml)	pH	Histidina (mM) de	sacarosa (%)	PS80 (%)
+ 30 % de la dosis alta	520	520	260	260	7,0	15	6	0,015
-30 % de la dosis baja	140	140	70	70	6,0	5	3	0,005
Alta/baja	520	520	260	260	6,0	5	3	0,005
Baja/alto	140	140	70	70	7,0	15	6	0,015

Las formulaciones límite se liofilizaron y se colocaron en estabilidad a 2-8 ºC, 25 ºC y 37 ºC. Los resultados mostrados en las Tablas 43-46 indican que todas las formulaciones límite eran estables durante 3 meses a las tres temperaturas, lo que confirma la robustez de la formulación de tetra-antígeno.

Tabla 43: Estabilidad límite: +30 % de la dosis alta

	t = 0	2-8 ºC, 1 mes	25 ºC, 1 mes	37 ºC, 1 mes	2-8 ºC, 3 meses	25 ºC, 3 meses	37 ºC, 3 meses
Aspecto	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa
Tiempo de reconstitución	< 30 segundos	< 30 segundos	< 30 segundos	< 30 segundos	< 30 segundos	< 30 segundos	< 30 segundos
pH	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
Aspecto	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa
Humedad	0,58	0,62	0,83	0,89	0,72	0,93	1,02

(continuación)

	t = 0	2-8 ºC, 1 mes	25 ºC, 1 mes	37 ºC, 1 mes	2-8 ºC, 3 meses	25 ºC, 3 meses	37 ºC, 3 meses
Fuerza de rmClfA (µg/ml) por II	500	460	460	470	460	460	460
Fuerza de MntC (µg/ml) por II	480	510	510	510	490	490	490
Fuerza de PC5 (µg/ml) por nefelometría	259	263	265	271	252	272	278
Fuerza de PC8 (µg/ml) por nefelometría	277	280	293	280	264	278	275
Pureza (%) por II	95,7	95,8	95,9	95,9	96,1	96,2	96,1
Desamidación de MntC (%) por II	3,1	3,0	3,0	3,0	2,8	2,8	2,7
Pureza de rmClfA (%) por FI-HPLC	97,9	98,1	97,9	98	97,7	97,5	97,8
Pureza de MntC (%) por FI-HPLC	98,1	98,2	97,8	97,9	97,7	97,6	97,9

Tabla 44: Estabilidad límite: -30 % de la dosis baja

	t = 0	2-8 ºC, 1 mes	25 ºC, 1 mes	37 ºC, 1 mes	2-8 ºC, 3 meses	25 ºC, 3 meses	37 ºC, 3 meses
Aspecto	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa
Tiempo de reconstitución	< 30 segundos	< 30 segundos	< 30 segundos	< 30 segundos	< 30 segundos	< 30 segundos	< 30 segundos
pH	5,8	5,9	5,9	5,9	5,8	5,7	5,8
Humedad	0,83	0,96	1,27	1,33	1,03	1,46	1,47
Fuerza de rmClfA (µg/ml) por II	140	130	130	130	130	130	120
Fuerza de MntC (µg/ml) por II	140	130	130	130	140	140	130
Fuerza de PC5 (µg/ml) por nefelometría	67	66	65	64	67	71	72
Fuerza de PC8 (µg/ml) por nefelometría	71	74	69	70	73	74	72
Pureza (%) por II	95,9	95,9	96,1	96,1	96,4	96,5	96,5
Desamidación de MntC (%) por II	2,8	2,8	2,7	2,6	2,5	2,4	2,4
Aspecto	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa
Pureza de rmClfA (%) por FI-HPLC	97,9	97,8	97,9	98	97,7	97,2	97,9

(continuación)

	t = 0	2-8 ºC, 1 mes	25 ºC, 1 mes	37 ºC, 1 mes	2-8 ºC, 3 meses	25 ºC, 3 meses	37 ºC, 3 meses
Pureza de MntC (%) por FI-HPLC	98	97,5	97,6	97,6	97,7	97,2	97,8

Tabla 45: Estabilidad límite: Alta/Baja

	t = 0	2-8 ºC, 1 mes	25 ºC, 1 mes	37 ºC, 1 mes	2-8 ºC, 3 meses	25 ºC, 3 meses	37 ºC, 3 meses
Aspecto	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa
Tiempo de reconstitución	< 30 segundos	< 30 segundos	< 30 segundos	< 30 segundos	< 30 segundos	< 30 segundos	< 30 segundos
pH	5,9	5,9	5,9	6,0	5,9	6,0	6,0
Humedad	0,5	0,57	0,86	1,05	0,58	1,14	1,20
Fuerza de rmClfA (µg/ml) por II	510	470	470	470	460	460	460
Fuerza de MntC (µg/ml) por II	490	520	510	510	500	500	500
Fuerza de PC5 (µg/ml) por nefelometría	251	259	252	262	256	259	260
Fuerza de PC8 (µg/ml) por nefelometría	263	269	278	272	270	273	265
Pureza (%) por II	95,9	96,1	96,1	96,1	96,2	96,4	96,3
Desamidación de MntC (%) por II	2,9	2,8	2,7	2,8	2,7	2,6	2,6
Pureza de rmClfA (%) por FI-HPLC	97,7	98	98,1	97,9	97,8	97,5	97,5
Pureza de MntC (%) por FI-HPLC	98,2	98,2	97,9	97,9	98,2	98,0	97,6

Tabla 46: Estabilidad límite: Baja/Alta

	t = 0	2-8 ºC, 1 mes	25 ºC, 1 mes	37 ºC, 1 mes	2-8 ºC, 3 meses	25 ºC, 3 meses	37 ºC, 3 meses
Aspecto	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa
Tiempo de reconstitución	< 30 segundos	< 30 segundos	< 30 segundos	< 30 segundos	< 30 segundos	< 30 segundos	< 30 segundos
pH	7,0	7,1	7,1	7,1	7,1	7,0	7,0
Aspecto	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa	Torta de color blanco esponjosa
Humedad	0,58	0,68	0,82	0,87	0,68	0,92	0,97
Fuerza de rmClfA (µg/ml) por II	140	120	130	130	120	120	120
Fuerza de MntC (µg/ml) por II	140	130	130	130	130	130	140
Fuerza de PC5 (µg/ml) por nefelometría	67	66	67	65	69	72	69
Fuerza de PC8 (µg/ml) por nefelometría	74	70	71	71	75	73	75

(continuación)

	t = 0	2-8 ºC, 1 mes	25 ºC, 1 mes	37 ºC, 1 mes	2-8 ºC, 3 meses	25 ºC, 3 meses	37 ºC, 3 meses
Pureza (%) por II	95,9	96,2	96,3	96	96,6	96,7	96,6
Desamidación de MntC (%) por II	3,0	2,6	2,6	2,9	2,4	2,4	2,3
Pureza de rmClfA (%) por FI-HPLC	97,8	97,7	97,9	97,7	97,4	97,3	97,3
Pureza de MntC (%) por FI-HPLC	98	97,9	97,9	97,7	97,5	97,2	97,3

Ejemplo 26: medicamento de tetra-antígeno: estabilidad a la congelación-descongelación

Se congelaron y descongelaron formulaciones líquidas pre-liofilizadas de tetra-antígeno de dosis alta (L44130-88-1) y de dosis baja (L44130-88-2) en viales Schott de tipo 1 durante cuatro ciclos. Las muestras se congelaron cada vez durante al menos 24 horas a -70 ºC y después se descongelaron a temperatura ambiente. Durante el ciclo de descongelación, los viales se controlaron estrechamente para que las formulaciones líquidas descongeladas no quedaran a temperatura ambiente durante un período prolongado. Esto se hizo para asegurar que los datos no reflejasen ningún corte de rmClfA ni desamidación de MntC como resultado de la incubación de las formulaciones a temperatura ambiente. Cada conjunto de congelación-descongelación (hecho por triplicado) se reunió y se analizó por FI-HPLC para determinar la pureza de rmClfA y de MntC, por II-HPLC para la concentración de rmClfA y MntC, por II-HPLC para la pureza de MntC y por nefelometría para las concentraciones de los conjugados de PC5 y PC8. Después de cuatro ciclos de congelación-descongelación, las purezas de rmClfA y MntC por FI-HPLC (Figura 33A) y la pureza de MntC por II-HPLC (Figura 33B) no cambiaron. Análogamente, las concentraciones de los antígenos (Figuras 33C y D) y el pH (Figura 33E) permanecieron constantes después de cuatro ciclos de congelación-descongelación.

Ejemplo 27: medicamento de tetra-antígeno: estabilidad después de la agitación

El objetivo de los estudios de medición de la estabilidad después de la agitación era asegurar que la formulación de tetra-antígeno que contenía polisorbato 80 al 0,01 % no mostrase problemas de adsorción con el sistema de cierre del envase. Se prepararon formulaciones pre-liofilizadas de tetra-antígeno de dosis alta (L44130-100) con polisorbato 80 al 0, 0,01 % y 0,03 % y las muestras se agitaron durante 24 horas a temperatura ambiente en un vial de liofilización/recipiente con cierre por tapón. Las muestras de control se pusieron a la misma temperatura ambiente, pero sin agitación. Para agitar, se fijó un agitador con formación de vórtice DVX-2500 VWR de múltiples tubos a 500 RPM en el modo de pulsos. La concentración de polisorbato 80 se acotó en un intervalo del 0 al 0,03 %.

Los ensayos clave incluyeron los siguientes: FI-HPLC para la detección de la escisión de rmClfA y la degradación de MntC (excluyendo desamidación), II-HPLC para controlar la desamidación de MntC, la concentración de los cuatro antígenos y el pH y la DO_{350}. Las Figuras 34A y B muestran que la pureza de rmClfA y MntC permanecieron similares después de la agitación. También se muestra en las Figuras 34C y D que los cuatro antígenos se recuperaron después de la agitación. El pH se mantuvo (Figura 34E) y la agitación no promovió la agregación de los antígenos como se controló por DO_{350} (Figura 34E). Todos los datos indican que la formulación es compatible con el sistema de cierre del recipiente de liofilización.

Aunque el cierre del recipiente de liofilización no contenga silicona, la formulación entre en contacto con silicona en los tapones de jeringuillas de vidrio que se utilizarán para reconstituir y administrar la vacuna.

Ejemplo 28: medicamento de tetra-antígeno: estudios ISCOMATRIX™

La estabilidad de la formulación de tetra-antígeno de dosis alta (rmClfA/rP305A/PC5-CRM_{197}/PC8-CRM_{197} 400/400/200/200 µg/ml) se analizó después de la reconstitución en histidina 10 mM, pH 6,5 con 20 unidades/ml de ISCOMATRIX™ con y sin NaCl 60 mM. La estabilidad se controló a 2-8 ºC y 25 ºC durante 24 horas. La pureza de MntC se analizó por IC-HPLC. A 25 ºC, el ISCOMATRIX™ con NaCl y NaCl control con sal mostró velocidades de desamidación similares (Figura 35B). El ISCOMATRIX™ sin sal mostró menor velocidad de desamidación. A 5 ºC, la velocidad de desamidación se redujo drásticamente (Figura 35A). No fue posible cuantificar la pureza de rmClfA directamente debido a la interferencia de ISCOMATRIX™ (Figuras 35C). Un análisis de superposiciones de curso temporal representativas indicó que el pico principal de rmClfA no cambió indicando la estabilidad de más de 24 horas a 25 ºC (Figura 35D). Se observaron resultados similares para todas las muestras a 2-8 ºC. No se detectaron cambios en la pureza de MntC después de 24 horas a 2-8 ºC (Figura 35E) y 25 ºC (Figura F) mediante FI-HPLC (Figura 35C). No se observaron cambios en las concentraciones de conjugado PC5-CRM_{197} y PC8-CRM_{197} después de 24 horas a 2-8 ºC (Figura 35G) y 25 ºC (Figura 35H). No se observaron cambios en las concentraciones de rmClfA o MntC después de 24 horas a 2-8 ºC (Figura 35I) y 25 ºC (Figura 35J).

Las concentraciones por ISCOMATRIX™ no cambiaron a lo largo de 24 horas a 2-8 ºC (Figura 36A) y 25 ºC (Figura 36B). El tamaño de partícula de ISCOMATRIX™ con NaCl aumentó de tamaño en ~50 nm y sin NaCl aumentó de tamaño en ~60 nm (Figura 36C). Todas las poblaciones se monodispersaron (<0,2). El pH de las formulaciones reconstituidas se mantuvo constante a lo largo del estudio de estabilidad (Figura 36D).

La estabilidad de la formulación de dosis baja de tetra-antígeno de dosis baja (rmClfA/rP305A/PC5-CRM_{197}/PC8-CRM_{197} 40/40/20/20 µg/ml) se analizó después de la reconstitución en histidina 10 mM, pH 6,5 con 20 unidades/ml de ISCOMATRIX™ con y sin NaCl 60 mM. No se detectaron cambios en la pureza de MntC mediante FI-HPLC después de 4 horas a 2-8 ºC (Figura 37A). No se detectó ningún aumento en la desamidación de MntC mediante IC-HPLC después de 4 horas a 2-8 ºC (Figuras 37B). Las cuatro concentraciones de antígeno se mantuvieron constantes durante todo el estudio (Figuras 37C y D).

El tamaño de partícula de ISCOMATRIX™ con NaCl aumentó después de 4 horas y sin NaCl permaneció constante, pero en ambos casos era mayor que el del ISCOMATRIX™ solo (Figura 38A). Las muestras recolectadas se polidspersaron (~0,3). El pH de las formulaciones reconstituidas se mantuvo constante después de 4 horas (Figura 38B).

Ejemplo 29: medicamento de tetra-antígeno: comparación de diluyente

Se realizó un estudio de estabilidad a corto plazo utilizando dosis bajas, medias y altas de MntC en la formulación de tetra-antígeno para comparar NaCl 60 mM, sacarosa al 4,5 % en agua y agua como diluyentes. Cada formulación contenía sacarosa al 4,5 %, PS80 al 0,01 % y la concentración de antígeno proporcionada en la Tabla 47 a un pH de 6,5.

Tabla 47: Formulaciones de medicamento de Tetra-antígeno

Dosis	N.º de Lote de Recon	Concentración de rP305A	Concentración de PC5-CRM197, PC8-CRM197, rmClfA, respectivamente
Baja	125426-036-A	40 ug/ml	60 ug/ml, 60 ug/ml, 120 ug/ml
Media	125426-036-B	120 ug/ml	60 ug/ml, 60 ug/ml, 120 ug/ml
Alta	125426-036-C	400 ug/ml	60 ug/ml, 60 ug/ml, 120 ug/ml

Los viales se almacenaron a 2-8 ºC antes del inicio del experimento y se sometieron a ensayo de estabilidad a 5 ºC y 25 ºC después de 2 y 7 días. Las formulaciones se compararon utilizando los siguientes ensayos: IC-HPLC para la desamidación y la pureza de MntC, FI-HPLC para la pureza de MntC y ClfA, II para la concentración de MntC y ClfA y nefelometría para la concentración de conjugados. Se proporcionan detalles de los resultados en las Tablas 48-56. La velocidad de desamidación de MntC fue mayor en las tres formulaciones reconstituidas con NaCl 60 mM y la MntC de dosis alta tuvo el nivel más alto de desamidación entre los tres niveles de dosis. Todos los demás resultados fueron comparables.

Tabla 48: Sumario de la estabilidad a corto plazo de MntC de dosis baja (125426-036-A) usando NaCl 60 mM como diluyente

	5 ºC, t = 0	5 ºC, 2 días	5 ºC, 7 días	25 ºC, 2 días	25 ºC, 7 días
Desamidación de MntC (%) por IC-HPLC	1,3	1,7	2,7	5,7	18,9
Pureza de MntC (%) por IC-HPLC	98,3	98,0	97,0	93,9	80,2
Pureza de MntC (%) por FI-HPLC	99,4	98,5	99,2	99,3	99,2
Pureza de ClfA (%) por FI-HPLC	97,6	98,2	97,8	97,5	98,0
Concentración de MntC (µg/ml) por II	41	42	41	41	41
Concentración de ClfA (µg/ml) por II	120	118	116	117	115
Concentración de PC5 (µg/ml) por nefelometría	61	63	64	61	64
Concentración de PC8 (µg/ml) por nefelometría	56	55	57	53	53

Tabla 49: Sumario de la estabilidad a corto plazo de MntC de dosis baja (125426-036-A) usando sacarosa al 4,5 % en agua como diluyente

	5 ºC, t = 0	5 ºC, 2 días	5 ºC, 7 días	25 ºC, 2 días	25 ºC, 7 días
Desamidación de MntC (%) por IC-HPLC	1,2	1,4	1,5	1,9	3,9
Pureza de MntC (%) por IC-HPLC	98,4	98,3	98,2	97,7	95,7
Pureza de MntC (%) por FI-HPLC	99,4	NT	99,2	99,3	99,3
Pureza de ClfA (%) por FI-HPLC	97,6	98,0	97,6	97,5	97,8

(continuación)

	5 ºC, t = 0	5 ºC, 2 días	5 ºC, 7 días	25 ºC, 2 días	25 ºC, 7 días
Concentración de MntC (µg/ml) por II	41	41	39	39	39
Concentración de ClfA (µg/ml) por II	119	118	114	117	115
Concentración de PC5 (µg/ml) por nefelometría	63	61	60	62	66
Concentración de PC8 (µg/ml) por nefelometría	59	58	59	58	58
NT - No ensayado					

Tabla 50: Sumario de la estabilidad a corto plazo de MntC de dosis baja (125426-036-A) usando como diluyente

	5 ºC, t = 0	5 ºC, 2 días	5 ºC, 7 días	25 ºC, 2 días	25 ºC, 7 días
Desamidación de MntC (%) por IC-HPLC	1,2	1,3	1,5	1,9	3,9
Pureza de MntC (%) por IC-HPLC	98,4	98,4	98,2	97,8	95,8
Pureza de MntC (%) por FI-HPLC	99,3	NT	99,4	99,3	99,4
Pureza de ClfA (%) por FI-HPLC	97,8	NT	98,2	97,4	98,8
Concentración de MntC (µg/ml) por II	40	40	39	39	40
Concentración de ClfA (µg/ml) por II	118	118	117	117	115
Concentración de PC5 (µg/ml) por nefelometría	59	62	63	61	66
Concentración de PC8 (µg/ml) por nefelometría	54	58	60	59	61
NT - No ensayado					

Tabla 51: Sumario de la estabilidad a corto plazo de MntC de dosis intermedia (125426-036-B) usando NaCl 60 mM como diluyente

	5 ºC, t = 0	5 ºC, 2 días	5 ºC, 7 días	25 ºC, 2 días	25 ºC, 7 días
Desamidación de MntC (%) por IC-HPLC	1,1	1,7	2,8	7,2	24,4
Pureza de MntC (%) por IC-HPLC	98,6	98,1	96,9	92,6	74,2
Pureza de MntC (%) por FI-HPLC	99,4	NT	99,2	99,4	99,4
Pureza de ClfA (%) por FI-HPLC	97,9	NT	98,1	97,8	98,3
Concentración de MntC (µg/ml) por II	131	135	132	130	127
Concentración de ClfA (µg/ml) por II	125	126	124	124	121
Concentración de PC5 (µg/ml) por nefelometría	65	64	67	62	68
Concentración de PC8 (µg/ml) por nefelometría	54	53	54	52	54
NT - No ensayado					

Tabla 52: Sumario de la estabilidad a corto plazo de MntC de dosis intermedia (125426-036-B) usando sacarosa al 4,5 % en agua como diluyente

	5 ºC, t = 0	5 ºC, 2 días	5 ºC, 7 días	25 ºC, 2 días	25 ºC, 7 días
Desamidación de MntC (%) por IC-HPLC	1,0	1,1	1,4	2,0	5,1
Pureza de MntC (%) por IC-HPLC	98,7	98,6	98,4	97,7	94,6
Pureza de MntC (%) por FI-HPLC	99,4	NT	99,3	99,3	99,4
Pureza de ClfA (%) por FI-HPLC	97,7	NT	97,8	97,5	97,9
Concentración de MntC (µg/ml) por II	132	133	129	132	124
Concentración de ClfA (µg/ml) por II	128	128	126	129	122
Concentración de PC5 (µg/ml) por nefelometría	60	70	68	68	73
Concentración de PC8 (µg/ml) por nefelometría	51	60	59	56	59
NT - No ensayado					

Tabla 53: Sumario de la estabilidad a corto plazo de MntC de dosis intermedia (125426-036-B) usando agua como diluyente

	5 ºC, t = 0	5 ºC, 2 días	5 ºC, 7 días	25 ºC, 2 días	25 ºC, 7 días
Desamidación de MntC (%) por IC-HPLC	1,0	1,1	1,4	2,0	5,3
Pureza de MntC (%) por IC-HPLC	98,7	98,6	98,4	97,7	94,4
Pureza de MntC (%) por FI-HPLC	99,4	NT	99,5	99,4	99,0
Pureza de ClfA (%) por FI-HPLC	97,6	NT	98,9	97,9	99,2
Concentración de MntC (µg/ml) por II	135	130	126	128	124
Concentración de ClfA (µg/ml) por II	131	125	123	125	119
Concentración de PC5 (µg/ml) por nefelometría	66	68	69	68	70
Concentración de PC8 (µg/ml) por nefelometría	56	57	62	56	58
NT - No ensayado					

Tabla 54: Sumario de la estabilidad a corto plazo de MntC de dosis alta (125426-036-C) usando NaCl 60 mM como diluyente

	5 ºC, t = 0	5 ºC, 2 días	5 ºC, 7 días	25 ºC, 2 días	25 ºC, 7 días
Desamidación de MntC (%) por IC-HPLC	1,2	1,9	3,4	8,1	27,3
Pureza de MntC (%) por IC-HPLC	98,6	97,9	96,3	91,6	71,4
Pureza de MntC (%) por FI-HPLC	99,3	99,3	NT	99,2	NT
Pureza de ClfA (%) por FI-HPLC	97,9	97,8	NT	98,0	NT
Concentración de MntC (µg/ml) por II	434	444	446	448	423
Concentración de ClfA (µg/ml) por II	121	122	123	121	119
Concentración de PC5 (µg/ml) por nefelometría	65	62	68	65	68
Concentración de PC8 (µg/ml) por nefelometría	54	55	55	52	56
NT - No ensayado					

Tabla 55: Sumario de la estabilidad a corto plazo de MntC de dosis alta (125426-036-C) usando sacarosa al 4,5 % en agua como diluyente

	5 ºC, t = 0	5 ºC, 2 días	5 ºC, 7 días	25 ºC, 2 días	25 ºC, 7 días
Desamidación de MntC (%) por IC-HPLC	1,2	1,4	2,0	3,2	10,6
Pureza de MntC (%) por IC-HPLC	98,6	98,3	97,7	96,6	88,8
Pureza de MntC (%) por FI-HPLC	99,4	99,3	NT	99,3	NT
Pureza de ClfA (%) por FI-HPLC	97,9	97,8	NT	98,0	NT
Concentración de MntC (µg/ml) por II	434	444	446	448	423
Concentración de ClfA (µg/ml) por II	121	122	123	121	119
Concentración de PC5 (µg/ml) por nefelometría	65	62	68	65	68
Concentración de PC8 (µg/ml) por nefelometría	54	55	55	52	56
NT - No ensayado					

Tabla 56: Sumario de la estabilidad a corto plazo de MntC de dosis alta (125426-036-C) usando agua como diluyente

	5 ºC, t = 0	5 ºC, 2 días	5 ºC, 7 días	25 ºC, 2 días	25 ºC, 7 días
Desamidación de MntC (%) por IC-HPLC	1,1	1,4	2,0	3,3	11,1
Pureza de MntC (%) por IC-HPLC	98,6	98,3	97,7	96,6	88,2
Pureza de MntC (%) por FI-HPLC	99,3	99,2	99,3	99,3	99,2

(continuación)

	5 ºC, t = 0	5 ºC, 2 días	5 ºC, 7 días	25 ºC, 2 días	25 ºC, 7 días
Pureza de ClfA (%) por FI-HPLC	98,1	98,2	98,6	97,8	99,0
Concentración de MntC (µg/ml) por II	447	452	429	426	436
Concentración de ClfA (µg/ml) por II	127	126	122	119	121
Concentración de PC5 (µg/ml) por nefelometría	67	68	67	66	69
Concentración de PC8 (µg/ml) por nefelometría	57	57	56	53	57

Ejemplo 30: medicamento de tetra-antígeno: formulaciones alternativas

Se realizaron ensayos de estabilidad sobre varias formulaciones diferentes de un medicamento de tetra-antígeno como se muestra en la Tabla 57.

Tabla 57: Formulaciones de medicamento e tetra-antígeno

ID de la Formulación	305/mClfA/PC5/PC8 (mg/ml)	pH	Tampón (mM)	Sacarosa (mg/ml)	Tensioactivo (mg/ml)	Excipiente (mg/ml)
124369-8-A	0,40/0,40/0,20/0,20	6,5	Histidina 10	45	PS80 0,10 mg/ml	0
124369-8-B	0,40/0,40/0,20/0,20	6,5	Histidina 10	90	PS80 0,10 mg/ml	0
124369-8-C	0,40/0,40/0,20/0,20	6,2	Histidina 10	90	PS80 0,10 mg/ml	0
124369-8-D	0,40/0,40/0,20/0,20	6,0	Histidina 10	90	PS80 0,10 mg/ml	0
124369-8-E	0,40/0,40/0,20/0,20	5,8	Histidina 10	90	PS80 0,10 mg/ml	0
124369-8-F	0,40/0,40/0,20/0,20	6,0	Succinato 10	90	PS80 0,10 mg/ml	0
124369-8-G	0,40/0,40/0,20/0,20	6,0	Histidina 10	90	PS80 0,10 mg/ml	EDTA 0,05 mg/ml
124369-8-H	0,40/0,40/0,20/0,20	6,0	Histidina 10	90	PS80 0,10 mg/ml	Metionina 0,1 mg/ml
124369-8-L	0,04/0,40/0,06/0,06	6,0	Histidina 10	90	PS80 0,10 mg/ml	0

Las formulaciones liofilizadas se reconstituyeron con 0,7 ml de agua y se sometieron a ensayo para determinar la estabilidad a 5 ºC y 25 ºC después de 1, 3 y 6 meses y a 40 ºC después de 1 y 3 meses. Las formulaciones se compararon mediante los siguientes ensayos: humedad de Karl Fischer, transparencia, color, detección de partículas, IC-HPLC para la desamidación y la pureza de MntC, FI-HPLC para la pureza de MntC y ClfA, II para la concentración de MntC y ClfA y nefelometría para la concentración de los conjugados. El porcentaje de humedad fue mayor en la formulación con 45 mg/ml de sacarosa. La cantidad de agua en la torta es un porcentaje de la masa total de la torta. De este modo, las tortas con sacarosa 90 mg/ml eran más robustos en el porcentaje de humedad debido al doble de la cantidad de la masa de sacarosa. Se proporcionan detalles de los resultados en las Tablas 58-66.

Tabla 58: Sumario de la estabilidad de la formulación de tetra-antígeno 124369-8-A

	5 ºC, t = 0	**5 ºC, 1 mes.**	**5 ºC, 3 meses.**	**5 ºC, 6 meses.**	**25 ºC, 1 mes.**	**25 ºC, 3 meses.**	**25 ºC, 6 meses.**	**40 ºC, 1 mes.**	**40 ºC, 3 meses.**
Humedad de Karl Fischer (% H_2O)	1,6	NE	1,9	2,0	NE	2,3	2,4	NE	2,8
Transparencia	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI
Color	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro
Partículas	1 partícula corta en forma de fibra de color blanco	1 partícula corta en forma de fibra de color blanco	1 partícula corta en forma de fibra de color blanco, 1 partícula pequeña redonda de color blanco, 1 partícula en forma de copo de color blanco	Esencialmente libre de partículas visibles	1 partícula corta en forma de fibra de color blanco	Esencialmente libre de partículas visibles	Esencialmente libre de partículas visibles	Esencialmente libre de partículas visibles	1 partícula en forma de copo de color blanco
Desamidación de MntC (%) por IC-HPLC	1,2	1,2	1,4	1,3	1,2	1,5	1,4	1,3	1,6
Pureza de MntC (%) por IC-HPLC	98,3	98,3	98,0	98,1	98,3	98,0	98,0	98,2	97,7
Pureza de MntC (%) por FI-HPLC	99,7	99,2	99,2	99,3	99,1	99,2	98,9	99,3	99,4
Pureza de ClfA (%) por FI-HPLC	97,2	95,3	95,0	93,2	96,4	95,0	92,9	96,2	95,0
Concentración de MntC (µg/ml) por II	493	498	476	477	396	488	484	513	484
Concentración de ClfA (µg/ml) por II	532	541	513	521	422	529	530	545	522
Concentración de PC5 (µg/ml) por nefelometría	297	NE	279	251	NE	308	243	NE	275
Concentración de PC8 (µg/ml) por nefelometría	337	NE	381	420	NE	420	383	NE	380
NE - no ensayado NMQ PRI - no más que el patrón de referencia EP I									

Tabla 59: Sumario de estabilidad de la formulación de tetra-antígeno 124369-8-B

	5 ºC, t = 0	**5 ºC, 1 mes.**	**5 ºC, 3 meses.**	**5 ºC, 6 meses.**	**25 ºC, 1 mes.**	**25 ºC, 3 meses.**	**25 ºC, 6 meses.**	**40 ºC, 1 mes.**	**40 ºC, 3 meses.**
Humedad de Karl Fischer (% H_2O)	1,2	NE	1,2	1,2	NE	1,4	1,5	NE	1,6
Transparencia	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI
Color	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro
Partículas	Esencialmente libre de partículas visibles	1 partícula corta en forma de fibra de color blanco	Esencialmente libre de partículas visibles	1 partícula larga en forma de fibra de color blanco	Esencialmente libre de partículas visibles	1 partícula corta en forma de fibra de color blanco	Esencialmente libre de partículas visibles	Esencialmente libre de partículas visibles	1 partícula corta en forma de fibra de color blanco
Desamidación de MntC (%) por IC-HPLC	1,2	1,2	1,5	1,3	1,2	1,5	1,3	1,3	1,6
Pureza de MntC (%) por IC-HPLC	98,3	98,4	98,0	98,1	98,3	98,0	98,2	98,2	97,8
Pureza de MntC (%) por FI-HPLC	99,7	99,2	99,4	99,1	99,0	99,2	98,3	99,2	99,1
Pureza de ClfA (%) por FI-HPLC	97,1	95,4	94,6	92,6	96,0	94,7	91,9	96,1	94,3
Concentración de MntC (µg/ml) por II	362	361	353	347	405	353	344	350	351
Concentración de ClfA (µg/ml) por II	396	397	386	383	442	386	380	362	383
Concentración de PC5 (µg/ml) por nefelometría	220	NE	187	211	NE	197	189	NE	180
Concentración de PC8 (µg/ml) por nefelometría	246	NE	279	314	NE	298	303	NE	272
NE - no ensayado NMQ PRI - no más que el patrón de referencia EP I									

Tabla 60: Sumario de la estabilidad de la formulación de tetra-antígeno 124369-8-C

	5 ºC, t = 0	**5 ºC, 1 mes.**	**5 ºC, 3 meses.**	**5 ºC, 6 meses.**	**25 ºC, 1 mes.**	**25 ºC, 3 meses.**	**25 ºC, 6 meses.**	**40 ºC, 1 mes.**	**40 ºC, 3 meses.**
Humedad de Karl Fischer (% H_2O)	0,9	NE	1,1	1,2	NE	1,3	1,5	NE	1,5
Transparencia	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI
Color	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro
Partículas	Esencialmente libre de partículas visibles	1 partícula corta en forma de fibra de color blanco	Esencialmente libre de partículas visibles	Esencialmente libre de partículas visibles	Esencialmente libre de partículas visibles	Esencialmente libre de partículas visibles	Esencialmente libre de partículas visibles	Esencialmente libre de partículas visibles	Esencialmente libre de partículas visibles
Desamidación de MntC (%) por IC-HPLC	1,2	1,2	1,4	1,3	1,2	1,5	1,3	1,2	1,6
Pureza de MntC (%) por IC-HPLC	98,3	98,3	98,1	98,2	98,4	98,0	98,1	98,3	97,9
Pureza de MntC (%) por FI-HPLC	99,7	99,1	99,1	98,4	99,2	99,2	98,4	99,1	99,2
Pureza de ClfA (%) por FI-HPLC	97,4	95,6	94,7	93,8	96,4	95,0	91,4	96,4	94,1
Concentración de MntC (µg/ml) por II	365	371	358	351	367	356	347	353	354
Concentración de ClfA (µg/ml) por II	394	403	386	384	392	385	376	376	382
Concentración de PC5 (µg/ml) por nefelometría	218	NE	198	189	NE	198	206	NE	190
Concentración de PC8 (µg/ml) por nefelometría	236	NE	299	287	NE	301	313	NE	281
NE - no ensayado NMQ PRI - no más que el patrón de referencia EP I									

Tabla 61: Sumario de la estabilidad de la formulación de tetra-antígeno 124369-8-D

	5 ºC, t = 0	**5 ºC, 1 mes.**	**5 ºC, 3 meses.**	**5 ºC, 6 meses.**	**25 ºC, 1 mes.**	**25 ºC, 3 meses.**	**25 ºC, 6 meses.**	**40 ºC, 1 mes.**	**40 ºC, 3 meses.**
Humedad de Karl Fischer (% H_2O)	1,1	NE	1,1	1,4	NE	1,4	1,5	NE	1,6
Transparencia	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI
Color	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro
Partículas	Esencialmente libre de partículas visibles	2 partículas cortas en forma de fibra de color blanco	1 partícula corta en forma de fibra de color blanco	1 partícula corta en forma de fibra de color blanco, 1 partícula pequeña redonda de color blanco	Esencialmente libre de partículas visibles	Esencialmente libre de partículas visibles	1 partícula corta en forma de fibra de color blanco, 1 partícula pequeña redonda de color blanco	1 partícula corta en forma de fibra de color blanco	Esencialmente libre de partículas visibles
Desamidación de MntC (%) por IC-HPLC	1,2	1,2	1,4	1,3	1,2	1,4	1,3	1,2	1,5
Pureza de MntC (%) por IC-HPLC	98,3	98,4	98,1	98,2	98,3	98,0	98,2	98,3	97,9
Pureza de MntC (%) por FI-HPLC	99,7	99,2	99,4	99,3	99,1	99,1	98,3	99,1	99,1
Pureza de ClfA (%) por FI-HPLC	97,4	95,8	95,0	94,0	96,3	94,7	92,9	95,9	94,3
Concentración de MntC (µg/ml) por II	369	357	355	350	360	353	348	349	353
Concentración de ClfA (µg/ml) por II	396	389	384	386	384	383	383	371	382
Concentración de PC5 (µg/ml) por nefelometría	215	NE	196	205	NE	210	191	NE	178
Concentración de PC8 (µg/ml) por nefelometría	247	NE	293	320	NE	300	293	NE	262

NE - no ensayado
NMQ PRI - no más que el patrón de referencia EP I

Tabla 62: Sumario de la estabilidad de la formulación de tetra-antígeno 124369-8-E

	5 ºC, t = 0	**5 ºC, 1 mes.**	**5 ºC, 3 meses.**	**5 ºC, 6 meses.**	**25 ºC, 1 mes.**	**25 ºC, 3 meses.**	**25 ºC, 6 meses.**	**40 ºC, 1 mes.**	**40 ºC, 3 meses.**
Humedad de Karl Fischer (% H_2O)	1,1	NE	1,2	1,2	NE	1,4	1,5	NE	1,6
Transparencia	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI
Color	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro
Partículas	Esencialmente libre de partículas visibles	Esencialmente libre de partículas visibles	Esencialmente libre de partículas visibles	Esencialmente libre de partículas visibles	1 partícula corta en forma de fibra de color blanco	Esencialmente libre de partículas visibles	1 partícula mediana en forma de fibra de color oscuro	Esencialmente libre de partículas visibles	Esencialmente libre de partículas visibles
Desamidación de MntC (%) por IC-HPLC	1,2	1,2	1,4	1,3	1,2	1,4	1,3	1,2	1,5
Pureza de MntC (%) por IC-HPLC	98,4	98,3	98,1	98,2	98,3	98,1	98,1	98,3	97,9
Pureza de MntC (%) por FI-HPLC	99,6	99,4	99,4	98,3	99,2	99,2	98,2	99,1	99,1
Pureza de ClfA (%) por FI-HPLC	97,1	96,0	94,8	93,6	96,3	94,7	91,6	96,5	94,8
Concentración de MntC (µg/ml) por II	362	356	353	338	350	349	344	363	351
Concentración de ClfA (µg/ml) por II	420	413	409	400	399	403	401	412	405
Concentración de PC5 (µg/ml) por nefelometría	215	NE	185	187	NE	197	187	NE	168
Concentración de PC8 (µg/ml) por nefelometría	226	NE	288	286	NE	298	292	NE	261
NE - no ensayado NMQ PRI - no más que el patrón de referencia EP I									

Tabla 63: Sumario de la estabilidad de la formulación de tetra-antígeno 124369-8-F

	5 ºC, t = 0	**5 ºC, 1 mes.**	**5 ºC,** 3 **meses.**	**5 ºC, 6 meses.**	**25 ºC, 1 mes.**	**25 ºC,** 3 **meses.**	**25 ºC, 6 meses.**	**40 ºC, 1 mes.**	**40 ºC,** 3 **meses.**
Humedad de Karl Fischer (% H_2O)	1,2	NE	1,4	1,3	NE	1,5	1,6	NE	1,7
Transparencia	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI
Color	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro
Partículas	Esencialmente libre de partículas visibles	1 partícula corta en forma de fibra de color blanco	1 partícula pequeña redonda de color blanco	1 partícula corta en forma de fibra de color oscuro	1 partícula corta en forma de fibra de color blanco	Esencialmente libre de partículas visibles	1 partícula corta en forma de fibra de color blanco	1 partícula corta en forma de fibra de color blanco	Esencialmente libre de partículas visibles
Desamidación de MntC (%) por IC-HPLC	1,3	1,2	1,4	1,3	1,3	1,4	1,4	1,3	1,6
Pureza de MntC (%) por IC-HPLC	98,2	98,3	98,1	98,1	98,3	98,0	98,1	98,2	97,8
Pureza de MntC (%) por FI-HPLC	99,7	99,1	97,2	98,4	99,1	99,2	98,4	99,1	99,3
Pureza de ClfA (%) por FI-HPLC	97,4	95,8	94,9	93,7	96,4	95,2	92,5	96,4	95,0
Concentración de MntC (µg/ml) por II	364	358	353	345	359	351	344	354	359
Concentración de ClfA (µg/ml) por II	392	382	384	378	378	378	375	362	384
Concentración de PC5 (µg/ml) por nefelometría	NE	NE	188	184	NE	189	198	NE	180
Concentración de PC8 (µg/ml) por nefelometría	NE	NE	283	280	NE	275	301	NE	283

NE - no ensayado
NMQ PRI - no más que el patrón de referencia EP I

Tabla 64: Sumario de la estabilidad de la formulación de tetra-antígeno 124369-8-G

	5 ºC, t = 0	**5 ºC, 1 mes.**	**5 ºC, 3 meses.**	**5 ºC, 6 meses.**	**25 ºC, 1 mes.**	**25 ºC, 3 meses.**	**25 ºC, 6 meses.**	**40 ºC, 1 mes.**	**40 ºC, 3 meses.**
Humedad de Karl Fischer (% H_2O)	1,2	NE	1,3	1,4	NE	1,5	1,7	NE	1,7
Transparencia	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI
Color	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro
Partículas	2 partículas pequeñas redondas de color blanco y 1 partícula en forma de copo de color blanco	Esencialmente libre de partículas visibles	Esencialmente libre de partículas visibles	Esencialmente libre de partículas visibles	Esencialmente libre de partículas visibles	1 partícula larga en forma de fibra de color blanco, 1 partícula corta en forma de fibra de color rojo	1 partícula corta en forma de fibra de color blanco, 2 particulas pequeñas redondas de color blanco	1 partícula corta en forma de fibra de color blanco	1 partícula corta en forma de fibra de color blanco, 1 partícula pequeña redonda de color blanco
Desamidación de MntC (%) por IC-HPLC	1,2	1,2	1,4	1,3	1,2	1,4	1,3	1,2	1,5
Pureza de MntC (%) por IC-HPLC	98,3	98,3	98,1	98,2	98,4	98,1	98,1	98,4	98,0
Pureza de MntC (%) por FI-HPLC	99,7	99,1	99,0	98,4	99,2	99,2	98,4	99,5	99,1
Pureza de ClfA (%) por FI-HPLC	96,9	95,9	94,6	93,4	96,4	95,0	92,0	96,0	95,5
Concentración de MntC (µg/ml) por II	363	357	355	346	363	352	339	361	354
Concentración de ClfA (µg/ml) por II	405	397	396	393	395	373	384	383	394
Concentración de PC5 (µg/ml) por nefelometría	223	NE	191	192	NE	203	194	NE	187
Concentración de PC8 (µg/ml) por nefelometría	238	NE	295	293	NE	308	305	NE	277
NE - no ensayado NMQ PRI - no más que el patrón de referencia EP I									

Tabla 65: Sumario de la estabilidad de la formulación de tetra-antígeno 124369-8-H

	5 ºC, t = 0	**5 ºC, 1 mes.**	**5 ºC, 3 meses.**	**5 ºC, 6 meses.**	**25 ºC, 1 mes.**	**25 ºC, 3 meses.**	**25 ºC, 6 meses.**	**40 ºC, 1 mes.**	**40 ºC, 3 meses.**
Humedad de Karl Fischer (% H_2O)	1,1	NE	1,3	1,3	NE	1,5	1,8	NE	1,7
Transparencia	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI
Color	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro
Partículas	Esencialmente libre de partículas visibles	1 partícula corta de color blanco similar a la plata	Esencialmente libre de partículas visibles	Esencialmente libre de partículas visibles	Esencialmente libre de partículas visibles	Esencialmente libre de partículas visibles	1 partícula corta en forma de fibra de color blanco, 1 partícula en forma de copo de color blanco	1 partícula en forma de copo de color blanco	Esencialmente libre de partículas visibles
Desamidación de MntC (%) por IC-HPLC	1,2	1,2	1,4	1,3	1,2	1,4	1,4	1,2	1,5
Pureza de MntC (%) por IC-HPLC	98,3	98,3	98,1	98,2	98,3	98,1	98,1	98,3	98,0
Pureza de MntC (%) por FI-HPLC	99,7	99,2	99,2	99,0	99,2	99,2	98,4	99,4	NE
Pureza de ClfA (%) por FI-HPLC	97,1	96,3	95,3	93,4	96,6	95,3	92,1	96,6	NE
Concentración de MntC (µg/ml) por II	366	357	345	342	355	355	346	351	352
Concentración de ClfA (µg/ml) por II	409	398	387	393	390	398	389	375	395
Concentración de PC5 (µg/ml) por nefelometría	213	NE	182	188	NE	208	188	NE	206
Concentración de PC8 (µg/ml) por nefelometría	233	NE	262	286	NE	310	283	NE	291
NE - no ensayado NMQ PRI - no más que el patrón de referencia EP I									

Tabla 66: Sumario de la estabilidad de la formulación de tetra-antígeno 124369-8-L

	5 °C, t = 0	**5 °C, 1 mes.**	**5 °C, 3 meses.**	**5 °C, 6 meses.**	**25 °C, 1 mes.**	**25 °C, 3 meses.**	**25 °C, 6 meses.**	**40 °C, 1 mes.**	**40 °C, 3 meses.**
Humedad de Karl Fischer (% H_2O)	1,0	NE	0,9	1,0	NE	1,1	1,4	NE	1,4
Transparencia	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI	NMQ PRI
Color	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro
Partículas	Esencialmente libre de partículas visibles	Esencialmente libre de partículas visibles	1 partícula pequeña redonda de color blanco	Esencialmente libre de partículas visibles	Esencialmente libre de partículas visibles	Esencialmente libre de partículas visibles	Esencialmente libre de partículas visibles	1 partícula corta en forma de fibra de color blanco, 1 partícula en forma de copo de color blanco	Esencialmente libre de partículas visibles
Desamidación de MntC (%) por IC-HPLC	1,7	1,7	1,9	1,7	1,7	2,0	1,7	1,7	2,0
Pureza de MntC (%) por IC-HPLC	97,7	97,9	97,5	97,8	97,9	97,5	97,9	97,9	97,5
Pureza de MntC (%) por FI-HPLC	98,5	98,5	99,0	98,9	98,4	98,9	98,9	98,4	99,0
Pureza de ClfA (%) por FI-HPLC	97,0	96,2	94,8	94,7	96,2	95,2	93,6	96,1	95,1
Concentración de MntC (µg/ml) por II	32	32	31	30	31	31	30	31	31
Concentración de ClfA (µg/ml) por II	422	435	417	416	419	418	414	410	419
Concentración de PC5 (µg/ml) por nefelometría	57	NE	53	56	NE	53	51	NE	55
Concentración de PC8 (µg/ml) por nefelometría	64	NE	80	86	NE	79	77	NE	80
NE - no ensayado NMQ PRI - no más que el patrón de referencia EP I									

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Wyeth LLC

<120> COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS ESTABLES DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

<130> PC057927A

<150> 61/426,476
<151> 22-12-2010

<160> 137

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 927
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 1

atgaaaaaat tagtaccttt attattagcc ttattacttc tagttgctgc atgtggtact 60

ggtggtaaac aaagcagtga taagtcaaat ggcaaattaa aagtagtaac gacgaattca 120

attttatatg atatggctaa aaatgttggt ggagacaacg tcgatattca tagtattgta 180

cctgttggtc aagatcctca tgaatatgaa gttaaaccta aagatattaa aaagttaact 240

gacgctgacg ttattttata caacggatta aatttagaga ctggtaacgg ttggtttgaa 300

aaagccttag aacaggctgg taaatcatta aaagataaaa aagttatcgc agtatcaaaa 360

gatgttaaac ctatctattt aaacggtgaa gaaggcaaca aagataaaca agatccacac 420

gcatggttaa gtttagataa cggtattaaa tacgtaaaaa caattcaaca aacatttatc 480

gataacgaca aaaaacataa agcagattat gaaaagcaag gtaacaaata cattgctcaa 540

ttggaaaaat taaataatga cagtaaagac aaatttaatg acattccaaa agaacaacgt 600

gccatgatta caagtgaagg tgccttcaag tacttctcaa aacaatacgg tattacacca 660

ggttatattt gggaaattaa cactgaaaaa caaggtacac cagaacaaat gagacaagct 720

attgagtttg ttaaaaagca caaattaaaa cacttattag tagaaacaag tgttgataag 780

aaagcaatgg aaagtttatc tgaagaaacg aagaaagata tctttggtga agtgtacaca 840

gattcaatcg gtaaagaagg cactaaaggt gactcttact acaaaatgat gaaatcaaat 900

attgaaactg tacacggaag catgaaa 927

<210> 2
<211> 309
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 2

Met Lys Lys Leu Val Pro Leu Leu Leu Ala Leu Leu Leu Leu Val Ala
1 5 10 15

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

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

Val Gly Gly Asp Asn Val Asp Ile His Ser Ile Val Pro Val Gly Gln
    50                  55                  60

Asp Pro His Glu Tyr Glu Val Lys Pro Lys Asp Ile Lys Lys Leu Thr
65                  70                  75                  80

Asp Ala Asp Val Ile Leu Tyr Asn Gly Leu Asn Leu Glu Thr Gly Asn
                85                  90                  95

Gly Trp Phe Glu Lys Ala Leu Glu Gln Ala Gly Lys Ser Leu Lys Asp
            100                 105                 110

Lys Lys Val Ile Ala Val Ser Lys Asp Val Lys Pro Ile Tyr Leu Asn
        115                 120                 125

Gly Glu Glu Gly Asn Lys Asp Lys Gln Asp Pro His Ala Trp Leu Ser
    130                 135                 140

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

Asp Asn Asp Lys Lys His Lys Ala Asp Tyr Glu Lys Gln Gly Asn Lys
                165                 170                 175

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

Asn Asp Ile Pro Lys Glu Gln Arg Ala Met Ile Thr Ser Glu Gly Ala
        195                 200                 205

Phe Lys Tyr Phe Ser Lys Gln Tyr Gly Ile Thr Pro Gly Tyr Ile Trp
    210                 215                 220

Glu Ile Asn Thr Glu Lys Gln Gly Thr Pro Glu Gln Met Arg Gln Ala
225                 230                 235                 240

Ile Glu Phe Val Lys Lys His Lys Leu Lys His Leu Leu Val Glu Thr
                245                 250                 255

Ser Val Asp Lys Lys Ala Met Glu Ser Leu Ser Glu Glu Thr Lys Lys
```

260 265 270

Asp Ile Phe Gly Glu Val Tyr Thr Asp Ser Ile Gly Lys Glu Gly Thr
275 280 285

Lys Gly Asp Ser Tyr Tyr Lys Met Met Lys Ser Asn Ile Glu Thr Val
290 295 300

His Gly Ser Met Lys
305

<210> 3
<211> 927
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 3

atgaaaaaat tagtaccttt attattagcc ttattacttc tagttgctgc atgtggtact 60

ggtggtaaac aaagcagtga taagtcaaat ggcaaattaa aagtagtaac gacgaattca 120

attttatatg atatggctaa aaatgttggt ggagacaacg tcgatattca tagtattgta 180

cctgttggtc aagatcctca tgaatatgaa gttaaaccta aagatattaa aaagttaact 240

gacgctgaca ttattttata caacggatta aatttagaga ctggtaacgg ttggtttgaa 300

aaagccttag aacaggctgg taaatcatta aaagataaaa aagttatcgc agtatcaaaa 360

gatgttaaac ctatctattt aaacggtgaa gaaggcaaca aagataaaca agatccacac 420

gcatggttaa gtttagataa tggtattaaa tacgtaaaaa caattcaaca aacatttatc 480

gataacgaca aaaaacataa agcagattat gaaaagcaag gtaacaaata cattgctcaa 540

ttggaaaaat taaataatga cagtaaagac aaatttaatg acattccaaa agaacaacgt 600

gccatgatta caagtgaagg tgccttcaag tacttctcaa aacaatacgg tattacacca 660

ggttatattt gggaaattaa cactgaaaaa caaggtacac ctgaacaaat gagacaagct 720

attgagtttg ttaaaaagca caaattaaaa cacttattag tagaaacaag tgttgataag 780

aaagcaatgg aaagtttatc tgaagaaacg aagaaagata tctttggtga agtgtacaca 840

gattcaatcg gtaaagaagg cactaaaggt gactcttatt acaaaatgat gaaatcaaat 900

attgaaactg tacacggaag catgaaa 927

<210> 4
<211> 309
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 4

Met Lys Lys Leu Val Pro Leu Leu Leu Ala Leu Leu Leu Leu Val Ala
1 5 10 15

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

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

Val Gly Gly Asp Asn Val Asp Ile His Ser Ile Val Pro Val Gly Gln
    50                  55                  60

Asp Pro His Glu Tyr Glu Val Lys Pro Lys Asp Ile Lys Lys Leu Thr
65                  70                  75                  80

Asp Ala Asp Ile Ile Leu Tyr Asn Gly Leu Asn Leu Glu Thr Gly Asn
                85                  90                  95

Gly Trp Phe Glu Lys Ala Leu Glu Gln Ala Gly Lys Ser Leu Lys Asp
            100                 105                 110

Lys Lys Val Ile Ala Val Ser Lys Asp Val Lys Pro Ile Tyr Leu Asn
        115                 120                 125

Gly Glu Glu Gly Asn Lys Asp Lys Gln Asp Pro His Ala Trp Leu Ser
    130                 135                 140

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

Asp Asn Asp Lys Lys His Lys Ala Asp Tyr Glu Lys Gln Gly Asn Lys
                165                 170                 175

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

Asn Asp Ile Pro Lys Glu Gln Arg Ala Met Ile Thr Ser Glu Gly Ala
        195                 200                 205

Phe Lys Tyr Phe Ser Lys Gln Tyr Gly Ile Thr Pro Gly Tyr Ile Trp
    210                 215                 220

Glu Ile Asn Thr Glu Lys Gln Gly Thr Pro Glu Gln Met Arg Gln Ala
225                 230                 235                 240

Ile Glu Phe Val Lys Lys His Lys Leu Lys His Leu Leu Val Glu Thr
                245                 250                 255

Ser Val Asp Lys Lys Ala Met Glu Ser Leu Ser Glu Glu Thr Lys Lys
```

260 265 270

Asp Ile Phe Gly Glu Val Tyr Thr Asp Ser Ile Gly Lys Glu Gly Thr
275 280 285

Lys Gly Asp Ser Tyr Tyr Lys Met Met Lys Ser Asn Ile Glu Thr Val
290 295 300

His Gly Ser Met Lys
305

<210> 5
<211> 936
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 5

atgaaaaaat tagtaccttt attattagcc ttattacttc tagttgctgc atgtggtact 60

ggtggtaaac aaagcagtga taagtcaaat ggcaaattaa aagtagtaac gacgaattca 120

attttatatg atatggctaa aaatgttggt ggagacaacg tcgatattca tagtattgta 180

cctgttggtc aagatcctca tgaatatgaa gttaaaccta aagatattaa aaagttaact 240

gacgctgacg ttatttttata caacggatta aatttagaga ctggtaacgg ttggtttgaa 300

aaagccttag aacaggctgg taaatcatta aaagataaaa aagttatcgc agtatcaaaa 360

gatgttaaac ctatctattt aaacggtgaa gaaggcaaca aagataaaca agatccacac 420

gcatggttaa gtttagataa cggtattaaa tacgtaaaaa caattcaaca aacatttatc 480

gataacgaca aaaaacataa agcagattat gaaaagcaag gtaacaaata cattgctcaa 540

ttggaaaaat taaataatga cagtaaagac agtaaagaca aatttaatga cattccaaaa 600

gaacaacgtg ccatgattac aagtgaaggt gccttcaagt acttctcaaa acaatacggt 660

attacaccag gttatatttg ggaaattaac actgaaaaac aaggtacacc tgaacaaatg 720

agacaagcta ttgagtttgt taaaaagcac aaattaaaac acttattagt agaaacaagt 780

gttgataaga aagcaatgga aagtttatct gaagaaacga agaaagatat ctttggtgaa 840

gtgtacacag attcaatcgg taaagaaggc actaaaggtg actcttacta caaaatgatg 900

aaatcaaata ttgaaactgt acacggaagc atgaaa 936

<210> 6
<211> 312
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 6

Met Lys Lys Leu Val Pro Leu Leu Leu Ala Leu Leu Leu Leu Val Ala
1 5 10 15

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

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

Val Gly Gly Asp Asn Val Asp Ile His Ser Ile Val Pro Val Gly Gln
    50                  55                  60

Asp Pro His Glu Tyr Glu Val Lys Pro Lys Asp Ile Lys Lys Leu Thr
65                  70                  75                  80

Asp Ala Asp Val Ile Leu Tyr Asn Gly Leu Asn Leu Glu Thr Gly Asn
                85                  90                  95

Gly Trp Phe Glu Lys Ala Leu Glu Gln Ala Gly Lys Ser Leu Lys Asp
            100                 105                 110

Lys Lys Val Ile Ala Val Ser Lys Asp Val Lys Pro Ile Tyr Leu Asn
        115                 120                 125

Gly Glu Glu Gly Asn Lys Asp Lys Gln Asp Pro His Ala Trp Leu Ser
    130                 135                 140

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

Asp Asn Asp Lys Lys His Lys Ala Asp Tyr Glu Lys Gln Gly Asn Lys
                165                 170                 175

Tyr Ile Ala Gln Leu Glu Lys Leu Asn Asn Asp Ser Lys Asp Ser Lys
            180                 185                 190

Asp Lys Phe Asn Asp Ile Pro Lys Glu Gln Arg Ala Met Ile Thr Ser
        195                 200                 205

Glu Gly Ala Phe Lys Tyr Phe Ser Lys Gln Tyr Gly Ile Thr Pro Gly
    210                 215                 220

Tyr Ile Trp Glu Ile Asn Thr Glu Lys Gln Gly Thr Pro Glu Gln Met
225                 230                 235                 240

Arg Gln Ala Ile Glu Phe Val Lys Lys His Lys Leu Lys His Leu Leu
                245                 250                 255

Val Glu Thr Ser Val Asp Lys Lys Ala Met Glu Ser Leu Ser Glu Glu
```

260 265 270

Thr Lys Lys Asp Ile Phe Gly Glu Val Tyr Thr Asp Ser Ile Gly Lys
275 280 285

Glu Gly Thr Lys Gly Asp Ser Tyr Tyr Lys Met Met Lys Ser Asn Ile
290 295 300

Glu Thr Val His Gly Ser Met Lys
305 310

<210> 7
<211> 927
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 7

atgaaaaaat tagtaccttt attattagcc ttattacttt tagttgctgc atgtggtact 60

ggtggtaaac aaagcagtga taagtcaaat ggcaaactaa aagtagtaac gacgaattca 120

attttatatg atatggctaa aaatgttggt ggagacaacg tcgatattca tagtattgta 180

cctgttggtc aagatcctca tgaatatgaa gttaaaccta aagatattaa aaagttaact 240

gacgctgacg ttatttttata caacggatta aatttagaga ctggtaacgg ttggtttgaa 300

aaagccttag aacaggctgg taaatcatta aaagataaaa aagttatcgc agtatcaaaa 360

gatgttaaac ctatctattt aaacggtgaa gaaggcaaca aagataaaca agatccacac 420

gcatggttaa gtttagataa cggtattaaa tacgtaaaaa caattcaaca aacatttatc 480

gataacgaca aaaaacataa agcagattat gaaaagcaag gtaacaaata cattgctcaa 540

ttggaaaaat taaataatga cagtaaagac aaatttaatg acattccaaa agaacaacgt 600

gccatgatta caagtgaagg tgccttcaaa tacttctcaa aacaatacgg tattacacca 660

ggttatattt gggaaattaa cactgaaaaa caaggtacac cagaacaaat gagacaagct 720

attgagtttg ttaaaaaaca caaattaaaa cacttattag tagaaacaag tgttgataag 780

aaagcaatgg aaagtttatc tgaagaaacg aagaaagata tctttggtga agtgtacaca 840

gattcaatcg gtaaagaagg cactaaaggt gactcttact acaaaatgat gaaatcaaat 900

attgatactg tacacggaag catgaaa 927

<210> 8
<211> 309
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 8

Met Lys Lys Leu Val Pro Leu Leu Leu Ala Leu Leu Leu Leu Val Ala
1 5 10 15

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

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

Val Gly Gly Asp Asn Val Asp Ile His Ser Ile Val Pro Val Gly Gln
    50                  55                  60

Asp Pro His Glu Tyr Glu Val Lys Pro Lys Asp Ile Lys Lys Leu Thr
65                  70                  75                  80

Asp Ala Asp Val Ile Leu Tyr Asn Gly Leu Asn Leu Glu Thr Gly Asn
                85                  90                  95

Gly Trp Phe Glu Lys Ala Leu Glu Gln Ala Gly Lys Ser Leu Lys Asp
            100                 105                 110

Lys Lys Val Ile Ala Val Ser Lys Asp Val Lys Pro Ile Tyr Leu Asn
        115                 120                 125

Gly Glu Glu Gly Asn Lys Asp Lys Gln Asp Pro His Ala Trp Leu Ser
    130                 135                 140

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

Asp Asn Asp Lys Lys His Lys Ala Asp Tyr Glu Lys Gln Gly Asn Lys
                165                 170                 175

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

Asn Asp Ile Pro Lys Glu Gln Arg Ala Met Ile Thr Ser Glu Gly Ala
        195                 200                 205

Phe Lys Tyr Phe Ser Lys Gln Tyr Gly Ile Thr Pro Gly Tyr Ile Trp
    210                 215                 220

Glu Ile Asn Thr Glu Lys Gln Gly Thr Pro Glu Gln Met Arg Gln Ala
225                 230                 235                 240

Ile Glu Phe Val Lys Lys His Lys Leu Lys His Leu Leu Val Glu Thr
                245                 250                 255

Ser Val Asp Lys Lys Ala Met Glu Ser Leu Ser Glu Glu Thr Lys Lys
```

260 265 270

Asp Ile Phe Gly Glu Val Tyr Thr Asp Ser Ile Gly Lys Glu Gly Thr
275 280 285

Lys Gly Asp Ser Tyr Tyr Lys Met Met Lys Ser Asn Ile Asp Thr Val
290 295 300

His Gly Ser Met Lys
305

<210> 9
<211> 927
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 9

atgaaaaaat tagtaccttt attattagcc ttattacttc tagttgctgc atgtggtact 60

gatggtaaac aaagcagtga taagtcaaat ggcaaattaa aagtagtaac gacgaattca 120

attttatatg atatggctaa aaatgttggt ggagacaacg tcgatattca tagtattgta 180

cctgttggtc aagatcctca tgaatatgaa gttaaaccta aagatattaa aaagttaact 240

gacgctgacg ttatttttata caacggatta aatttagaga ctggtaacgg ttggtttgaa 300

aaagccttag aacaggctgg taaatcatta aaagataaaa aagttatcgc agtatcaaaa 360

gatgttaaac ctatctattt aaacggtgaa gaaggcaaca aagataaaca agatccacac 420

gcatggttaa gtttagataa cggtattaaa tacgtaaaaa caattcaaca aacatttatc 480

gataacgaca aaaaacataa agcagattat gaaaagcaag gtaacaaata cattgctcaa 540

ttggaaaaat taaataatga cagtaaagac aaatttaatg acattccaaa agaacaacgt 600

gccatgatta caagtgaagg tgccttcaag tacttctcaa aacaatacgg tattacacca 660

ggttatattt gggaaattaa cactgaaaaa caaggtacac ctgaacaaat gagacaagct 720

attgagtttg ttaaaaagca caaattaaaa cacttattag tagaaacaag tgttgataag 780

aaagcaatgg aaagtttatc tgaagaaacg aagaaagata tctttggtga agtgtacaca 840

gattcaatcg gtaaagaagg cactaaaggt gactcttact acaaaatgat gaaatcaaat 900

attgaaactg tacacggaag catgaaa 927

<210> 10
<211> 309
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 10

Met Lys Lys Leu Val Pro Leu Leu Leu Ala Leu Leu Leu Leu Val Ala
1 5 10 15

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

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

Val Gly Gly Asp Asn Val Asp Ile His Ser Ile Val Pro Val Gly Gln
    50                  55                  60

Asp Pro His Glu Tyr Glu Val Lys Pro Lys Asp Ile Lys Lys Leu Thr
65                  70                  75                  80

Asp Ala Asp Val Ile Leu Tyr Asn Gly Leu Asn Leu Glu Thr Gly Asn
                85                  90                  95

Gly Trp Phe Glu Lys Ala Leu Glu Gln Ala Gly Lys Ser Leu Lys Asp
            100                 105                 110

Lys Lys Val Ile Ala Val Ser Lys Asp Val Lys Pro Ile Tyr Leu Asn
        115                 120                 125

Gly Glu Glu Gly Asn Lys Asp Lys Gln Asp Pro His Ala Trp Leu Ser
    130                 135                 140

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

Asp Asn Asp Lys Lys His Lys Ala Asp Tyr Glu Lys Gln Gly Asn Lys
                165                 170                 175

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

Asn Asp Ile Pro Lys Glu Gln Arg Ala Met Ile Thr Ser Glu Gly Ala
        195                 200                 205

Phe Lys Tyr Phe Ser Lys Gln Tyr Gly Ile Thr Pro Gly Tyr Ile Trp
    210                 215                 220

Glu Ile Asn Thr Glu Lys Gln Gly Thr Pro Glu Gln Met Arg Gln Ala
225                 230                 235                 240

Ile Glu Phe Val Lys Lys His Lys Leu Lys His Leu Leu Val Glu Thr
                245                 250                 255

Ser Val Asp Lys Lys Ala Met Glu Ser Leu Ser Glu Glu Thr Lys Lys
```

260 265 270

Asp Ile Phe Gly Glu Val Tyr Thr Asp Ser Ile Gly Lys Glu Gly Thr
275 280 285

Lys Gly Asp Ser Tyr Tyr Lys Met Met Lys Ser Asn Ile Glu Thr Val
290 295 300

His Gly Ser Met Lys
305

<210> 11
<211> 927
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 11

atgaaaaaat tagtaccttt attattagcc ttattacttc tagttgctgc atgtggtact 60

ggtggtaaac aaagcagtga taagtcaaat ggcaaattaa aagtagtaac gacgaattca 120

attttatatg atatggctaa aaatgttggt ggagacaacg tcgatattca tagtattgta 180

cctgttggtc aagatcctca tgaatatgaa gttaaaccta aagatattaa aaagttaact 240

gacgctgacg ttattttata caacggatta aatttagaga ctggtaacgg ttggtttgaa 300

aaagccttag aacaggctgg taaatcatta aaagataaaa aagttatcgc agtatcaaaa 360

gatgttaaac ctatctattt aaacggtgaa gaaggcaaca aagataaaca agatccacac 420

gcatggttaa gtttagataa cggtattaaa tacgtaaaaa caattcaaca aacatttatc 480

gataacgaca aaaaacataa agcatattat gaaaagcaag gtaacaaata cattgctcaa 540

ttggaaaaat taaataatga cagtaaagac aaatttaatg acattccaaa agaacaacgt 600

gccatgatta caagtgaagg tgccttcaag tacttctcaa aacaatacgg tattacacca 660

ggttatattt gggaaattaa cactgaaaaa caaggtacac ctgaacaaat gagacaagct 720

attgagtttg ttaaaaagca caaattaaaa cacttattag tagaaacaag tgttgataag 780

aaagcaatgg aaagtttatc tgaagaaacg aagaaagata tctttggtga agtgtacaca 840

gattcaatcg gtaaagaagg cactaaaggt gactcttact acaaaatgat gaaatcaaat 900

attgatactg tacacggaag catgaaa 927

<210> 12
<211> 309
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 12

Met Lys Lys Leu Val Pro Leu Leu Leu Ala Leu Leu Leu Leu Val Ala
1 5 10 15

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

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

Val Gly Gly Asp Asn Val Asp Ile His Ser Ile Val Pro Val Gly Gln
    50                  55                  60

Asp Pro His Glu Tyr Glu Val Lys Pro Lys Asp Ile Lys Lys Leu Thr
65                  70                  75                  80

Asp Ala Asp Val Ile Leu Tyr Asn Gly Leu Asn Leu Glu Thr Gly Asn
                85                  90                  95

Gly Trp Phe Glu Lys Ala Leu Glu Gln Ala Gly Lys Ser Leu Lys Asp
            100                 105                 110

Lys Lys Val Ile Ala Val Ser Lys Asp Val Lys Pro Ile Tyr Leu Asn
        115                 120                 125

Gly Glu Glu Gly Asn Lys Asp Lys Gln Asp Pro His Ala Trp Leu Ser
    130                 135                 140

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

Asp Asn Asp Lys Lys His Lys Ala Tyr Tyr Glu Lys Gln Gly Asn Lys
                165                 170                 175

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

Asn Asp Ile Pro Lys Glu Gln Arg Ala Met Ile Thr Ser Glu Gly Ala
        195                 200                 205

Phe Lys Tyr Phe Ser Lys Gln Tyr Gly Ile Thr Pro Gly Tyr Ile Trp
    210                 215                 220

Glu Ile Asn Thr Glu Lys Gln Gly Thr Pro Glu Gln Met Arg Gln Ala
225                 230                 235                 240

Ile Glu Phe Val Lys Lys His Lys Leu Lys His Leu Leu Val Glu Thr
                245                 250                 255

Ser Val Asp Lys Lys Ala Met Glu Ser Leu Ser Glu Glu Thr Lys Lys
```

260 265 270

Asp Ile Phe Gly Glu Val Tyr Thr Asp Ser Ile Gly Lys Glu Gly Thr
275 280 285

Lys Gly Asp Ser Tyr Tyr Lys Met Met Lys Ser Asn Ile Asp Thr Val
290 295 300

His Gly Ser Met Lys
305

<210> 13
<211> 927
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 13

atgaaaaaat tagtaccttt attattagcc ttattacttc tagttgctgc atgtggtact 60

ggtggtaaac aaagcagtga taagtcaaat ggcaaattaa aagtagtaac gacgaattca 120

attttatatg atatggctaa aaatgttggt ggagacaacg tcgatattca tagtattgta 180

cctgttggtc aagatcctca tgaatatgaa gttaaaccta aagatattaa aaagttaact 240

gacgctgacg ttattttata caacggatta aatttagaga ctggtaacgg ttggtttgaa 300

aaagccttag aacaggctgg taaatcatta aaagataaaa aagttatcgc agtatcaaaa 360

gatgttaaac ctatctattt aaacggtgaa gaaggcaaca aagataaaca agatccacac 420

gcatggttaa gtttagataa cggtattaaa tacgtaaaaa caattcaaca aacatttatc 480

gataacgaca aaaaacataa agcagattat gaaaagcaag gtaacaaata cattgctcaa 540

ttggaaaaat taaataatga cagtaaagac aaatttaatg acrttccaaa agaacaacgt 600

gccatgatta caagtgaagg tgccttcaag tacttctcaa aacaatacgg tattacacca 660

ggttatattt gggaaattaa cactgaaaaa caaggtacac ctgaacaaat gagacaagct 720

attgagtttg ttaaaaagca caaattaaaa cacttattag tagaaacaag tgttgataag 780

aaagcaatgg aaagtttatc tgaagaaacg aagaaagata tctttggtga agtgtacaca 840

gattcaatcg gtaaagaagg cactaaaggt gactcttact acaaaatgat gaaatcaaat 900

attgatactg tacacggaag catgaaa 927

<210> 14
<211> 309
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<220>
<221> MOD_RES
<222> (195)..(195)
<223> Cualquier aminoácido

<400> 14

```
Met Lys Lys Leu Val Pro Leu Leu Leu Ala Leu Leu Leu Leu Val Ala
1               5                  10                  15

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

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

Val Gly Gly Asp Asn Val Asp Ile His Ser Ile Val Pro Val Gly Gln
    50                  55                  60

Asp Pro His Glu Tyr Glu Val Lys Pro Lys Asp Ile Lys Lys Leu Thr
65                  70                  75                  80

Asp Ala Asp Val Ile Leu Tyr Asn Gly Leu Asn Leu Glu Thr Gly Asn
                85                  90                  95

Gly Trp Phe Glu Lys Ala Leu Glu Gln Ala Gly Lys Ser Leu Lys Asp
            100                 105                 110

Lys Lys Val Ile Ala Val Ser Lys Asp Val Lys Pro Ile Tyr Leu Asn
        115                 120                 125

Gly Glu Glu Gly Asn Lys Asp Lys Gln Asp Pro His Ala Trp Leu Ser
    130                 135                 140

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

Asp Asn Asp Lys Lys His Lys Ala Asp Tyr Glu Lys Gln Gly Asn Lys
                165                 170                 175

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

Asn Asp Xaa Pro Lys Glu Gln Arg Ala Met Ile Thr Ser Glu Gly Ala
        195                 200                 205

Phe Lys Tyr Phe Ser Lys Gln Tyr Gly Ile Thr Pro Gly Tyr Ile Trp
    210                 215                 220

Glu Ile Asn Thr Glu Lys Gln Gly Thr Pro Glu Gln Met Arg Gln Ala
225                 230                 235                 240
```

```
Ile Glu Phe Val Lys Lys His Lys Leu Lys His Leu Leu Val Glu Thr
                245                 250                 255

Ser Val Asp Lys Lys Ala Met Glu Ser Leu Ser Glu Glu Thr Lys Lys
            260                 265                 270

Asp Ile Phe Gly Glu Val Tyr Thr Asp Ser Ile Gly Lys Glu Gly Thr
        275                 280                 285

Lys Gly Asp Ser Tyr Tyr Lys Met Met Lys Ser Asn Ile Asp Thr Val
    290                 295                 300

His Gly Ser Met Lys
305
```

<210> 15
<211> 1626
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 15

```
ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aagcagaata agtattcgat tagacgtttt      60
acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaacgatac tatttgggat aggcaatcat     120
caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacgcaat cttcgaaaaa taatgcaagt     180
gcagattccg aaaaaaacaa tacgatagaa acacctcaat taaatacaac ggctaatgat     240
acatctgata ttagtgcaaa cacaaacagt gcgaatgtag atagcacagc aaaaccaatg     300
tctacacaaa cgagcaatac cactacaaca gagccagctt caacaaatga aacacctcac     360
ccgacggcaa ttaaagatca agcaactgct gcaaaaatgc aagatcaaac tgttcctcaa     420
gaagcaaatt ctcaagtaga taataaaaca acgaatgatg ctaatagcat agcaacaaac     480
agtgagctta aaaatcctca aacattagat ttaccacaat catcaccaca aacgatttcc     540
aatgcgcaag gaactagtaa accaagtgtt agaacgagag ctgtacgtag tcttgcagtt     600
actgaacctg tagtaaatgc tgctgatgct aaaggtacaa atgtaaatgg tcaagttacg     660
gcaagtgatt tcaagttaga aaagactaca tttgacccta accaaagtgg taacacattt     720
atggcggcaa attttaaagt ggcagggaaa gtgaaatcag gggattattt tacagcgaag     780
ttaccagata gtgtaactgg taatggagat gtggattact ctaactcgaa taatacgatg     840
ccaattgcag atattaaaag tacgaatggc gatgttgtag ctaaagcaac atatgatatc     900
ttgactaaga cgtatacatt tgtctttaca gattatgtaa atgataaaga aaatattaac     960
ggacaatttt cattaccatt atttacagac agagcaaagg cacctaaatc aggaacatat    1020
gatgcaaata ttaatattgc ggatgaaatg tttaataata aaattactta taactatagt    1080
```

tcaccaattg caggaattga taagccaaat ggcgcgaaca tttcttctca aattattggt 1140

gtagatacag cttcaggtca aaacacatac aagcaaacgg tatttgttaa ccctaagcaa 1200

cgagttttag gtaatacgtg ggtgtatatt aaaggttacc aagataaaat cgaagaaagt 1260

agcggtaaag taagtgctac agatacaaaa ctgagaattt ttgaagtgaa tgatacatct 1320

aaattatcag atagctacta tgcagaccca aatgactcta accttaaaga agtaactgat 1380

caatttaaag ataaaatttc atacaaatac gataacgtag caagtattaa ttttggtgat 1440

ataaataaaa cgtatgtcgt tttagtcgaa ggtcattatg ataatactgg taaaaacttg 1500

aaaacacagg ttattcaaga aaatattgac ccagcgacag gtaaagatta cagtattttc 1560

ggttggaata atgagaatgt tgtacgttat ggaggcggaa gtgctgatgg tgattcagca 1620

gtaaat 1626

<210> 16
<211> 542
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 16

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

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

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

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

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

Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn Val Asp Ser Thr
85 90 95

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

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

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

```
Gln Val Asp Asn Lys Thr Thr Asn Asp Ala Asn Ser Ile Ala Thr Asn
145                 150                 155                 160

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

Gln Thr Ile Ser Asn Ala Gln Gly Thr Ser Lys Pro Ser Val Arg Thr
            180                 185                 190

Arg Ala Val Arg Ser Leu Ala Val Thr Glu Pro Val Val Asn Ala Ala
        195                 200                 205

Asp Ala Lys Gly Thr Asn Val Asn Gly Gln Val Thr Ala Ser Asp Phe
    210                 215                 220

Lys Leu Glu Lys Thr Thr Phe Asp Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Phe
225                 230                 235                 240

Met Ala Ala Asn Phe Lys Val Ala Gly Lys Val Lys Ser Gly Asp Tyr
                245                 250                 255

Phe Thr Ala Lys Leu Pro Asp Ser Val Thr Gly Asn Gly Asp Val Asp
            260                 265                 270

Tyr Ser Asn Ser Asn Asn Thr Met Pro Ile Ala Asp Ile Lys Ser Thr
        275                 280                 285

Asn Gly Asp Val Val Ala Lys Ala Thr Tyr Asp Ile Leu Thr Lys Thr
    290                 295                 300

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

Gly Gln Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
                325                 330                 335

Ser Gly Thr Tyr Asp Ala Asn Ile Asn Ile Ala Asp Glu Met Phe Asn
            340                 345                 350

Asn Lys Ile Thr Tyr Asn Tyr Ser Ser Pro Ile Ala Gly Ile Asp Lys
        355                 360                 365

Pro Asn Gly Ala Asn Ile Ser Ser Gln Ile Ile Gly Val Asp Thr Ala
    370                 375                 380

Ser Gly Gln Asn Thr Tyr Lys Gln Thr Val Phe Val Asn Pro Lys Gln
385                 390                 395                 400
```

Arg Val Leu Gly Asn Thr Trp Val Tyr Ile Lys Gly Tyr Gln Asp Lys
405 410 415

Ile Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Ser Ala Thr Asp Thr Lys Leu Arg
420 425 430

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

Asp Pro Asn Asp Ser Asn Leu Lys Glu Val Thr Asp Gln Phe Lys Asp
450 455 460

Lys Ile Ser Tyr Lys Tyr Asp Asn Val Ala Ser Ile Asn Phe Gly Asp
465 470 475 480

Ile Asn Lys Thr Tyr Val Val Leu Val Glu Gly His Tyr Asp Asn Thr
485 490 495

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

Thr Gly Lys Asp Tyr Ser Ile Phe Gly Trp Asn Asn Glu Asn Val Val
515 520 525

Arg Tyr Gly Gly Gly Ser Ala Asp Gly Asp Ser Ala Val Asn
530 535 540

<210> 17
<211> 1626
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 17

ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aagcagaata agtattcgat tagacgtttt 60

acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaactatac tatttgggat aggcaatcat 120

caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacgcaat cttcgaaaaa taatgcaagt 180

gcagattccg aaaaaaacaa tacgatagaa acacctcaat taaatacaac ggctaatgat 240

acatctgata ttagtgcaaa cacaaacagt gcgaatgtag atagcacagc aaaaacaatg 300

tctacacaaa cgagcaatac cactacaaca gagccagctt caacaaatga aacacctcaa 360

ccgacggcaa ttaaagatca agcaactgct gcaaaaatgc aagatcaaac tgttcctcaa 420

gaagcaaatt ctcaagtaga taataaaaca acgaatgatg ctaataacat agcaacaaac 480

agtgagctta aaaatcctca aacattagat ttaccacaat catcaccaca aacgatttcc 540

aatgcgcaag gaactagtaa accaagtgtt agaacgagag ctgtacgtag tcttgcagtt 600

gctgaacctg tagtaaatgc tgctgatgct aaaggtacaa atgtaaatga taaagttacg 660

gcaagtgatt tcaagttaga aaagactgca tttgacccta accaaagtgg taacacattt 720

atggcggcaa attttaaagt gactggacaa gtgaaatcag gggattattt tacagcgaag 780

ttaccagata gtgtaactgg taatggagac gtggattact ctaattcaaa taatacgatg 840

ccaattgcag acattaaaag tacgaatggc gatgttgtag ctaaagcaac atatgatatc 900

ttgactaaga cgtatacatt tgtctttaca gattatgtaa atgataaaga aaatattaac 960

ggacaatttt cattaccttt atttacagac cgagcaaagg cacctaaatc aggaacatat 1020

gatgcaaata ttaatattgc ggatgaaatg tttgataata aaattactta taactatagt 1080

tcgccaattg caggaattga taagccaaat ggcgcgaaca tttcttctca aattattggt 1140

gtagatacag cttcaggtca aaacacatac aagcaaacgg tatttgttaa ccctaagcaa 1200

cgagttttag gtaatacgtg ggtgtatatt aaaggttacc aagataaaat cgaagaaagt 1260

agcggtaaag taagtgctac agatacaaaa ctgagaattt ttgaagtgaa tgatacatct 1320

aaattatcag atagctacta tgcagaccca aatgactcta accttaaaga agtgactggt 1380

gagtttaaag ataaaatttc atacaaatac gataacgtag caagtattaa ttttggtgat 1440

ataaataaaa cgtatgttgt attagtggaa ggtcactatg ataatactgg taaaaacttg 1500

aaaacacagg ttattcaaga aaatattgac ccagcgacag gtaaagacta cagtattttc 1560

ggttggaata atgagaatgt tgtacgttat ggaggcggaa gtgctgatgg tgattcagca 1620

gtaaat 1626

<210> 18
<211> 542
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 18

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

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

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

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

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

```
Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn Val Asp Ser Thr
                85                  90                  95

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

Ala Ser Thr Asn Glu Thr Pro Gln Pro Thr Ala Ile Lys Asp Gln Ala
        115                 120                 125

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

Gln Val Asp Asn Lys Thr Thr Asn Asp Ala Asn Asn Ile Ala Thr Asn
145                 150                 155                 160

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

Gln Thr Ile Ser Asn Ala Gln Gly Thr Ser Lys Pro Ser Val Arg Thr
            180                 185                 190

Arg Ala Val Arg Ser Leu Ala Val Ala Glu Pro Val Val Asn Ala Ala
        195                 200                 205

Asp Ala Lys Gly Thr Asn Val Asn Asp Lys Val Thr Ala Ser Asp Phe
    210                 215                 220

Lys Leu Glu Lys Thr Ala Phe Asp Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Phe
225                 230                 235                 240

Met Ala Ala Asn Phe Lys Val Thr Gly Gln Val Lys Ser Gly Asp Tyr
                245                 250                 255

Phe Thr Ala Lys Leu Pro Asp Ser Val Thr Gly Asn Gly Asp Val Asp
            260                 265                 270

Tyr Ser Asn Ser Asn Asn Thr Met Pro Ile Ala Asp Ile Lys Ser Thr
        275                 280                 285

Asn Gly Asp Val Val Ala Lys Ala Thr Tyr Asp Ile Leu Thr Lys Thr
    290                 295                 300

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

Gly Gln Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
```

325 330 335

Ser Gly Thr Tyr Asp Ala Asn Ile Asn Ile Ala Asp Glu Met Phe Asp
340 345 350

Asn Lys Ile Thr Tyr Asn Tyr Ser Ser Pro Ile Ala Gly Ile Asp Lys
355 360 365

Pro Asn Gly Ala Asn Ile Ser Ser Gln Ile Ile Gly Val Asp Thr Ala
370 375 380

Ser Gly Gln Asn Thr Tyr Lys Gln Thr Val Phe Val Asn Pro Lys Gln
385 390 395 400

Arg Val Leu Gly Asn Thr Trp Val Tyr Ile Lys Gly Tyr Gln Asp Lys
405 410 415

Ile Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Ser Ala Thr Asp Thr Lys Leu Arg
420 425 430

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

Asp Pro Asn Asp Ser Asn Leu Lys Glu Val Thr Gly Glu Phe Lys Asp
450 455 460

Lys Ile Ser Tyr Lys Tyr Asp Asn Val Ala Ser Ile Asn Phe Gly Asp
465 470 475 480

Ile Asn Lys Thr Tyr Val Val Leu Val Glu Gly His Tyr Asp Asn Thr
485 490 495

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

Thr Gly Lys Asp Tyr Ser Ile Phe Gly Trp Asn Asn Glu Asn Val Val
515 520 525

Arg Tyr Gly Gly Gly Ser Ala Asp Gly Asp Ser Ala Val Asn
530 535 540

<210> 19
<211> 1626
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 19

ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aagcagaata agtattcgat tagacgtttt 60

acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaactatac tatttgggat aggcaatcat 120

caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacgcaat cttcgaaaaa taatgcaagt 180

gcagattccg aaaaaaacaa tacgatagaa acacctcaat taaatacaac ggctaatgat 240

acatctgata ttagtgcaaa cacaaacagt gcgaatgtag atagcacagc aaaaccaatg 300

tctacacaaa cgagcaatac cactacaaca gagccagctt caacaaatga aacacctcaa 360

ccgacggcaa ttaaagatca agcaactgct gcaaaaatgc aagatcaaac tgttcctcaa 420

gaagcaaatt ctcaagtaga taataaaaca acgaatgatg ctaatagcat agcgacaaac 480

agcgagctta aaaatcctca atcattagat ttaccacaat catcaccaca aacgatttcc 540

aatgcgcaag gaactagtaa accaagtgtt agaacgagag ctgtacgtag tcttgcagtt 600

gctgaacctg tagtaaatgc tgctgatgct aaaggtacaa atgtaaatga taaagttacg 660

gcaaaagatt ttcaattaga aaagactaca tttgacccta accaaagtgg taatactttt 720

atggcggcaa actttacagt gactggacaa gtgaaatcag gggattattt tacagcgaag 780

ttaccagata gtgtaactgg taatggagac gtggattact ctaattcaaa taatacgatg 840

ccaattgcag atatagtaaa cgataaaaat gaagttgtag caaaagcgac atatgatatt 900

ttgactaaga catatacatt tgtctttaca gattatgtaa atgataagca aaatattaat 960

gggaaatttt cattaccatt atttacagac cgagcaaagg cacctaaatc aggaatatat 1020

gatgcgaata ttaatattgc ggatgaaatg tttaataata aaattactta taactatagt 1080

tcgccaattg caggaattga taagccaaat ggcgcgaaca tttcttctca aattattggt 1140

gtagatacag cttcaggtca aaatacatac aagcaaacgg tatttgttaa ccctaagcaa 1200

cgagttttag gtaatacgtg ggtgtatatt aaaggttacc aagataaaat cgaagaaagt 1260

agcggtaaag taagtgctac agatacaaaa ctgagaattt ttgaagtgaa tgatacatct 1320

aaattatcag atagctacta tgcggaccca aatgactcta accttaaaga agtgactggt 1380

gagtttaata atagaatttt ttatgaacat ccaaacgtag caagtattaa ttttggtgat 1440

ataaataaaa cgtatgtcgt tttagttgaa ggtcactatg ataatactgg taaaaacttg 1500

aaaacacagg ttattcaaga aaatattgac ccagcgacag gtaaagacta cagtattttc 1560

ggatggaata atgagaatgt tgtacgttat ggtggtggaa gtgctgatgg tgattcagca 1620

gtaaat 1626

<210> 20
<211> 542
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 20

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

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

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

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

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

 Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn Val Asp Ser Thr
                 85                  90                  95

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

 Ala Ser Thr Asn Glu Thr Pro Gln Pro Thr Ala Ile Lys Asp Gln Ala
         115                 120                 125

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

 Gln Val Asp Asn Lys Thr Thr Asn Asp Ala Asn Ser Ile Ala Thr Asn
 145                 150                 155                 160

 Ser Glu Leu Lys Asn Pro Gln Ser Leu Asp Leu Pro Gln Ser Ser Pro
                 165                 170                 175

 Gln Thr Ile Ser Asn Ala Gln Gly Thr Ser Lys Pro Ser Val Arg Thr
             180                 185                 190

 Arg Ala Val Arg Ser Leu Ala Val Ala Glu Pro Val Val Asn Ala Ala
         195                 200                 205

 Asp Ala Lys Gly Thr Asn Val Asn Asp Lys Val Thr Ala Lys Asp Phe
     210                 215                 220

 Gln Leu Glu Lys Thr Thr Phe Asp Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Phe
 225                 230                 235                 240

 Met Ala Ala Asn Phe Thr Val Thr Gly Gln Val Lys Ser Gly Asp Tyr
                 245                 250                 255
```

```
Phe Thr Ala Lys Leu Pro Asp Ser Val Thr Gly Asn Gly Asp Val Asp
            260                 265                 270

Tyr Ser Asn Ser Asn Asn Thr Met Pro Ile Ala Asp Ile Val Asn Asp
        275                 280                 285

Lys Asn Glu Val Val Ala Lys Ala Thr Tyr Asp Ile Leu Thr Lys Thr
    290                 295                 300

Tyr Thr Phe Val Phe Thr Asp Tyr Val Asn Asp Lys Gln Asn Ile Asn
305                 310                 315                 320

Gly Lys Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
                325                 330                 335

Ser Gly Ile Tyr Asp Ala Asn Ile Asn Ile Ala Asp Glu Met Phe Asn
            340                 345                 350

Asn Lys Ile Thr Tyr Asn Tyr Ser Ser Pro Ile Ala Gly Ile Asp Lys
        355                 360                 365

Pro Asn Gly Ala Asn Ile Ser Ser Gln Ile Ile Gly Val Asp Thr Ala
    370                 375                 380

Ser Gly Gln Asn Thr Tyr Lys Gln Thr Val Phe Val Asn Pro Lys Gln
385                 390                 395                 400

Arg Val Leu Gly Asn Thr Trp Val Tyr Ile Lys Gly Tyr Gln Asp Lys
                405                 410                 415

Ile Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Ser Ala Thr Asp Thr Lys Leu Arg
            420                 425                 430

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

Asp Pro Asn Asp Ser Asn Leu Lys Glu Val Thr Gly Glu Phe Asn Asn
    450                 455                 460

Arg Ile Phe Tyr Glu His Pro Asn Val Ala Ser Ile Asn Phe Gly Asp
465                 470                 475                 480

Ile Asn Lys Thr Tyr Val Val Leu Val Glu Gly His Tyr Asp Asn Thr
                485                 490                 495

Gly Lys Asn Leu Lys Thr Gln Val Ile Gln Glu Asn Ile Asp Pro Ala
            500                 505                 510
```

Thr Gly Lys Asp Tyr Ser Ile Phe Gly Trp Asn Asn Glu Asn Val Val
515 520 525

Arg Tyr Gly Gly Gly Ser Ala Asp Gly Asp Ser Ala Val Asn
530 535 540

<210> 21
<211> 1626
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 21

ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aagcagaata agtattcgat tagacgtttt 60

acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaactatac tatttgggat aggcaatcat 120

caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacgcaat cttcgaaaaa taatgcaagt 180

gcagattccg aaaaaaacaa tacgatagaa acacctcaat taaatacaac ggctaatgat 240

acatctgata ttagtgcaaa cacaaacagt gcgaatgtag atagcacagc aaaaccaatg 300

tctacacaaa cgagcaatac cactacaaca gagccagctt caacaaatga aacacctcaa 360

ccgacggcaa ttaaagatca agcaactgct gcaaaaatgc aagatcgaac tgttcctcaa 420

gaagcaaatt ctcaagtaga taataaaaca acgaatgatg ctaatagcat aacaacaaac 480

agtgagctta aaaatcctca aacattagat ttaccacaat catcaccaca aacgatttcc 540

aatgcgcaag gaactagtaa accaagtgtt agaacgagag ctgtacgtag tcttgcagtt 600

gctgaacctg tagtaaatgc tgctgatgct aaaggcacaa atgtaaatga taaagttacg 660

gcaaaagatt ttcaattaga aaagactaca tttgacccta accaaagtgg taatactttt 720

atggcggcaa actttacagt gactggacaa gtgaaatcag gggattattt tacagcgaag 780

ttaccagaaa gtttaactgg taatggagac gtggattact ctaactcgaa taatacgatg 840

ccaattgcag atattaaaag tacgaatggc aatgttgtag ctaaagcaac atatgatatc 900

ttgactaaga cgtatacatt tgtctttaca gattatgtaa atgataaaga aaatattaac 960

ggacaatttt cattaccttt atttacagac cgagcaaagg cacctaaatc aggaacatat 1020

gatgcaaata ttaatattgc ggatgaaatg tttaacaata aaattactta taactatagt 1080

tcaccaattg caggaattga taagccaaat ggcgcgaaca tttcttctca aattattggt 1140

gtagatacag cttcaggtca aaacacatac aagcaaacgg tatttgttaa ccctaagcaa 1200

cgagttttag gtaatacgtg ggtgtatatt aaaggttacc aagataaaat cgaagaaagt 1260

agcggtaaag taagtgctac agatacaaaa ctgagaattt ttgaagtgaa tgatacatct 1320

aaattatcag atagctacta tgcggaccca aatgactcta atcttaaaga agtaactgat 1380

caatttaagg ataaaatcac ttataaatac caaaatgtag caagtattaa ttttggtgat 1440

attactaaaa cgtatgttgt attagtggaa ggtcactatg ataatactgg taaaaacttg 1500

aaaacacagg ttattcaaga aaatattgac ccagcgacag gtaaagacta cagtattttc 1560

ggatggaata atgagaatgt tgtacgttat ggtggtggaa gtgctgatgg tgattcagca 1620

gtaaat 1626

<210> 22
<211> 542
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 22

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

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

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

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

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

Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn Val Asp Ser Thr
                85                  90                  95

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

Ala Ser Thr Asn Glu Thr Pro Gln Pro Thr Ala Ile Lys Asp Gln Ala
        115                 120                 125

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

Gln Val Asp Asn Lys Thr Thr Asn Asp Ala Asn Ser Ile Thr Thr Asn
145                 150                 155                 160

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

Gln Thr Ile Ser Asn Ala Gln Gly Thr Ser Lys Pro Ser Val Arg Thr
            180                 185                 190
```

```
Arg Ala Val Arg Ser Leu Ala Val Ala Glu Pro Val Val Asn Ala Ala
        195                 200                 205

Asp Ala Lys Gly Thr Asn Val Asn Asp Lys Val Thr Ala Lys Asp Phe
    210                 215                 220

Gln Leu Glu Lys Thr Thr Phe Asp Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Phe
225                 230                 235                 240

Met Ala Ala Asn Phe Thr Val Thr Gly Gln Val Lys Ser Gly Asp Tyr
                245                 250                 255

Phe Thr Ala Lys Leu Pro Glu Ser Leu Thr Gly Asn Gly Asp Val Asp
            260                 265                 270

Tyr Ser Asn Ser Asn Asn Thr Met Pro Ile Ala Asp Ile Lys Ser Thr
        275                 280                 285

Asn Gly Asn Val Val Ala Lys Ala Thr Tyr Asp Ile Leu Thr Lys Thr
    290                 295                 300

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

Gly Gln Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
                325                 330                 335

Ser Gly Thr Tyr Asp Ala Asn Ile Asn Ile Ala Asp Glu Met Phe Asn
            340                 345                 350

Asn Lys Ile Thr Tyr Asn Tyr Ser Ser Pro Ile Ala Gly Ile Asp Lys
        355                 360                 365

Pro Asn Gly Ala Asn Ile Ser Ser Gln Ile Ile Gly Val Asp Thr Ala
    370                 375                 380

Ser Gly Gln Asn Thr Tyr Lys Gln Thr Val Phe Val Asn Pro Lys Gln
385                 390                 395                 400

Arg Val Leu Gly Asn Thr Trp Val Tyr Ile Lys Gly Tyr Gln Asp Lys
                405                 410                 415

Ile Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Ser Ala Thr Asp Thr Lys Leu Arg
            420                 425                 430

Ile Phe Glu Val Asn Asp Thr Ser Lys Leu Ser Asp Ser Tyr Tyr Ala
        435                 440                 445
```

```
Asp Pro Asn Asp Ser Asn Leu Lys Glu Val Thr Asp Gln Phe Lys Asp
    450                 455                 460

Lys Ile Thr Tyr Lys Tyr Gln Asn Val Ala Ser Ile Asn Phe Gly Asp
465                 470                 475                 480

Ile Thr Lys Thr Tyr Val Val Leu Val Glu Gly His Tyr Asp Asn Thr
                485                 490                 495

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

Thr Gly Lys Asp Tyr Ser Ile Phe Gly Trp Asn Asn Glu Asn Val Val
        515                 520                 525

Arg Tyr Gly Gly Gly Ser Ala Asp Gly Asp Ser Ala Val Asn
    530                 535                 540
```

<210> 23
<211> 1620
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 23

ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aagcagaata agtattcgat tagacgtttt 60

acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaactatac tatttgggat aggcaatcat 120

caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacgcaat cttcgaaaaa taatgcaagt 180

gcagattccg aaaaaaacaa tacgatagaa acacctcaat taaatactaa tgatacatct 240

gatattagtg caaacacaaa cagtgcgaat gtagatagca cagcaaaacc aatgtctaca 300

caaacgagca ataccactac aacagagcca gcttcaacaa atgaaacacc tcaaccgacg 360

gcaattaaag atcaagcaac tgctgcaaaa atgcaagatc gaactgttcc tcaagaagca 420

aattctcaag tagataataa aacaacgaat gatgctaata gcataacaac aaacagtgag 480

cttaaaaatc ctcaaacatt agatttacca caatcatcac cacaaacgat ttccaatgcg 540

caaggaacta gtaaaccaag tgttagaacg agagctgtac gtagtcttgc agttgctgaa 600

cctgtagtaa atgctgctga tgctaaaggc acaaatgtaa atgataaagt tacggcaaaa 660

gattttcaat tagaaaagac tacatttgac cctaaccaaa gtggtaatac ttttatggcg 720

gcaaacttta cagtgactgg acaagtgaaa tcaggggatt attttacagc gaagttacca 780

gaaagtttaa ctggtaatgg agacgtggat tactctaact cgaataatac gatgccaatt 840

gcagatatta aaagtacgaa tggcaatgtt gtagctaaag caacatatga tatcttgact 900

aagacgtata catttgtctt tacagattat gtaaatgata aagaaaatat taacggacaa 960

ttttcattac ctttatttac agaccgagca aaggcaccta aatcaggaac atatgatgca 1020

aatattaata ttgcggatga aatgtttaac aataaaatta cttataacta tagttcacca 1080

attgcaggaa ttgataagcc aaatggcgcg aacatttctt ctcaaattat tggtgtagat 1140

acagcttcag gtcaaaacac atacaagcaa acggtatttg ttaaccctaa gcaacgagtt 1200

ttaggtaata cgtgggtgta tattaaaggt taccaagata aaatcgaaga aagtagcggt 1260

aaagtaagtg ctacagatac aaaactgaga atttttgaag tgaatgatac atctaaatta 1320

tcagatagct actatgcgga cccaaatgac tctaatctta aagaagtaac tgatcaattt 1380

aaggataaaa tcacttataa ataccaaaat gtagcaagta ttaattttgg tgatattact 1440

aaaacgtatg ttgtattagt ggaaggtcac tatgataata ctggtaaaaa cttgaaaaca 1500

caggttattc aagaaaatat tgacccagcg acaggtaaag actacagtat tttcggatgg 1560

aataatgaga atgttgtacg ttatggtggt ggaagtgctg atggtgattc agcagtaaat 1620

<210> 24
<211> 540
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 24

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

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

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

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

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

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

Pro Met Ser Thr Gln Thr Ser Asn Thr Thr Thr Thr Glu Pro Ala Ser
            100                 105                 110

Thr Asn Glu Thr Pro Gln Pro Thr Ala Ile Lys Asp Gln Ala Thr Ala
        115                 120                 125
```

```
Ala Lys Met Gln Asp Arg Thr Val Pro Gln Glu Ala Asn Ser Gln Val
    130                 135                 140

Asp Asn Lys Thr Thr Asn Asp Ala Asn Ser Ile Thr Thr Asn Ser Glu
145                 150                 155                 160

Leu Lys Asn Pro Gln Thr Leu Asp Leu Pro Gln Ser Ser Pro Gln Thr
                165                 170                 175

Ile Ser Asn Ala Gln Gly Thr Ser Lys Pro Ser Val Arg Thr Arg Ala
            180                 185                 190

Val Arg Ser Leu Ala Val Ala Glu Pro Val Val Asn Ala Ala Asp Ala
        195                 200                 205

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

Glu Lys Thr Thr Phe Asp Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Phe Met Ala
225                 230                 235                 240

Ala Asn Phe Thr Val Thr Gly Gln Val Lys Ser Gly Asp Tyr Phe Thr
                245                 250                 255

Ala Lys Leu Pro Glu Ser Leu Thr Gly Asn Gly Asp Val Asp Tyr Ser
            260                 265                 270

Asn Ser Asn Asn Thr Met Pro Ile Ala Asp Ile Lys Ser Thr Asn Gly
        275                 280                 285

Asn Val Val Ala Lys Ala Thr Tyr Asp Ile Leu Thr Lys Thr Tyr Thr
    290                 295                 300

Phe Val Phe Thr Asp Tyr Val Asn Asp Lys Glu Asn Ile Asn Gly Gln
305                 310                 315                 320

Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys Ser Gly
                325                 330                 335

Thr Tyr Asp Ala Asn Ile Asn Ile Ala Asp Glu Met Phe Asn Asn Lys
            340                 345                 350

Ile Thr Tyr Asn Tyr Ser Ser Pro Ile Ala Gly Ile Asp Lys Pro Asn
        355                 360                 365

Gly Ala Asn Ile Ser Ser Gln Ile Ile Gly Val Asp Thr Ala Ser Gly
    370                 375                 380
```

```
Gln Asn Thr Tyr Lys Gln Thr Val Phe Val Asn Pro Lys Gln Arg Val
385                 390                 395                 400

Leu Gly Asn Thr Trp Val Tyr Ile Lys Gly Tyr Gln Asp Lys Ile Glu
                405                 410                 415

Glu Ser Ser Gly Lys Val Ser Ala Thr Asp Thr Lys Leu Arg Ile Phe
            420                 425                 430

Glu Val Asn Asp Thr Ser Lys Leu Ser Asp Ser Tyr Tyr Ala Asp Pro
        435                 440                 445

Asn Asp Ser Asn Leu Lys Glu Val Thr Asp Gln Phe Lys Asp Lys Ile
    450                 455                 460

Thr Tyr Lys Tyr Gln Asn Val Ala Ser Ile Asn Phe Gly Asp Ile Thr
465                 470                 475                 480

Lys Thr Tyr Val Val Leu Val Glu Gly His Tyr Asp Asn Thr Gly Lys
                485                 490                 495

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

Lys Asp Tyr Ser Ile Phe Gly Trp Asn Asn Glu Asn Val Val Arg Tyr
        515                 520                 525

Gly Gly Gly Ser Ala Asp Gly Asp Ser Ala Val Asn
    530                 535                 540
```

<210> 25
<211> 1626
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 25

ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aagcagaata agtattcgat tagacgtttt 60

acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaactatac tatttgggat aggcaatcat 120

caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacgcaat cttcgaaaaa taatgcaagt 180

gcagattccg aaaaaaacaa tatgatagaa acacctcaat taaatacaac ggctaatgat 240

acatctgata ttagtgcaaa cacaaacagt gcgaatgtag atagcacaac aaaaccaatg 300

tctacacaaa cgagcaatac cactacaaca gagccagctt caacaaatga aacacctcaa 360

ccgacggcaa ttaaaaatca agcaactgct gcaaaaatgc aagatcaaac tgttcctcaa 420

gaagcaaatt ctcaagtaga taataaaaca acgaatgatg ctaatagcat agcaacaaac 480

agtgagctta aaaattctca aacattagat ttaccacaat catcaccaca aacgatttcc 540

aatgcgcaag gaactagtaa accaagtgtt agaacgagag ctgtacgtag tttagctgtt 600

gctgaaccgg tagtaaatgc tgctgatgct aaaggtacaa atgtaaatga taaagttacg 660

gcaagtaatt tcaagttaga aaagactaca tttgacccta atcaaagtgg taacacattt 720

atggcggcaa attttacagt gacagataaa gtgaaatcag gggattattt tacagcgaag 780

ttaccagata gtttaactgg taatggagac gtggattatt ctaattcaaa taatacgatg 840

ccaattgcag acattaaaag tacgaatggc gatgttgtag ctaaagcaac atatgatatc 900

ttgactaaga cgtatacatt tgtctttaca gattatgtaa ataataaaga aaatattaac 960

ggacaatttt cattaccttt atttacagac cgagcaaagg cacctaaatc aggaacatat 1020

gatgcgaata ttaatattgc ggatgaaatg tttaataata aaattactta taactatagt 1080

tcgccaattg caggaattga taaaccaaat ggcgcgaaca tttcttctca aattattggt 1140

gtagatacag cttcaggtca aaacacatac aagcaaacag tatttgttaa ccctaagcaa 1200

cgagttttag gtaatacgtg ggtgtatatt aaaggctacc aagataaaat cgaagaaagt 1260

agcggtaaag taagtgctac agatacaaaa ctgagaattt ttgaagtgaa tgatacatct 1320

aaattatcag atagctacta tgcagatcca aatgactcta accttaaaga agtaacagac 1380

caatttaaaa atagaatcta ttatgagcat ccaaatgtag ctagtattaa atttggtgat 1440

attactaaaa catatgtagt attagtagaa gggcattacg acaatacagg taagaactta 1500

aaaactcagg ttattcaaga aaatgttgat cctgtaacaa atagagacta cagtattttc 1560

ggttggaata atgagaatgt tgtacgttat ggtggtggaa gtgctgatgg tgattcagca 1620

gtaaat 1626

<210> 26
<211> 542
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 26

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

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

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

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

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

Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn Val Asp Ser Thr
                85                  90                  95

Thr Lys Pro Met Ser Thr Gln Thr Ser Asn Thr Thr Thr Thr Glu Pro
            100                 105                 110

Ala Ser Thr Asn Glu Thr Pro Gln Pro Thr Ala Ile Lys Asn Gln Ala
        115                 120                 125

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

Gln Val Asp Asn Lys Thr Thr Asn Asp Ala Asn Ser Ile Ala Thr Asn
145                 150                 155                 160

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

Gln Thr Ile Ser Asn Ala Gln Gly Thr Ser Lys Pro Ser Val Arg Thr
            180                 185                 190

Arg Ala Val Arg Ser Leu Ala Val Ala Glu Pro Val Val Asn Ala Ala
        195                 200                 205

Asp Ala Lys Gly Thr Asn Val Asn Asp Lys Val Thr Ala Ser Asn Phe
    210                 215                 220

Lys Leu Glu Lys Thr Thr Phe Asp Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Phe
225                 230                 235                 240

Met Ala Ala Asn Phe Thr Val Thr Asp Lys Val Lys Ser Gly Asp Tyr
                245                 250                 255

Phe Thr Ala Lys Leu Pro Asp Ser Leu Thr Gly Asn Gly Asp Val Asp
            260                 265                 270

Tyr Ser Asn Ser Asn Asn Thr Met Pro Ile Ala Asp Ile Lys Ser Thr
        275                 280                 285

Asn Gly Asp Val Val Ala Lys Ala Thr Tyr Asp Ile Leu Thr Lys Thr
    290                 295                 300

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

```
Gly Gln Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
                325                 330                 335

Ser Gly Thr Tyr Asp Ala Asn Ile Asn Ile Ala Asp Glu Met Phe Asn
            340                 345                 350

Asn Lys Ile Thr Tyr Asn Tyr Ser Ser Pro Ile Ala Gly Ile Asp Lys
        355                 360                 365

Pro Asn Gly Ala Asn Ile Ser Ser Gln Ile Ile Gly Val Asp Thr Ala
    370                 375                 380

Ser Gly Gln Asn Thr Tyr Lys Gln Thr Val Phe Val Asn Pro Lys Gln
385                 390                 395                 400

Arg Val Leu Gly Asn Thr Trp Val Tyr Ile Lys Gly Tyr Gln Asp Lys
                405                 410                 415

Ile Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Ser Ala Thr Asp Thr Lys Leu Arg
            420                 425                 430

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

Asp Pro Asn Asp Ser Asn Leu Lys Glu Val Thr Asp Gln Phe Lys Asn
    450                 455                 460

Arg Ile Tyr Tyr Glu His Pro Asn Val Ala Ser Ile Lys Phe Gly Asp
465                 470                 475                 480

Ile Thr Lys Thr Tyr Val Val Leu Val Glu Gly His Tyr Asp Asn Thr
                485                 490                 495

Gly Lys Asn Leu Lys Thr Gln Val Ile Gln Glu Asn Val Asp Pro Val
            500                 505                 510

Thr Asn Arg Asp Tyr Ser Ile Phe Gly Trp Asn Asn Glu Asn Val Val
        515                 520                 525

Arg Tyr Gly Gly Gly Ser Ala Asp Gly Asp Ser Ala Val Asn
    530                 535                 540
```

<210> 27
<211> 1626
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 27

ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aagcagaata agtattcgat tagacgtttt 60

acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaactatac tatttgggat aggcaatcat 120

caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacgcaat cttcgaaaaa taatgcaagt 180

gcagattccg aaaaaaacaa tatgatagaa acacctcaat taaatacaac ggctaatgat 240

acatctgata ttagtgcaaa cacaaacagt gcgaatgtag atagcacaac aaaaccaatg 300

tctacacaaa cgagcaatac cactacaaca gagccagctt caacaaatga aacacctcaa 360

ccgacggcaa ttaaaaatca agcaactgct gcaaaaatgc aagatcaaac tgttcctcaa 420

gaagcaaatt ctcaagtaga taataaaaca acgaatgatg ctaatagcat agcaacaaac 480

agtgagctta aaaattctca aacattagat ttaccacaat catcaccaca aacgatttcc 540

aatgcgcaag gaactagtaa accaagtgtt agaacgagag ctgtacgtag tttagctgtt 600

gctgaaccgg tagtaaatgc tgctgatgct aaaggtacaa atgtaaatga taaagttacg 660

gcaagtaatt tcaagttaga aaagactaca tttgacccta atcaaagtgg taacacattt 720

atggcggcaa attttacagt gacagataaa gtgaaatcag gggattattt tacagcgaag 780

ttaccagata gtttaactgg taatggagac gtggattatt ctaattcaaa taatacgatg 840

ccaattgcag acattaaaag tacgaatggc gatgttgtag ctaaagcaac atatgatatc 900

ttgactaaga cgtatacatt tgtctttaca gattatgtaa ataataaaga aaatattaac 960

ggacaatttt cattaccttt atttacagac cgagcaaagg cacctaaatc aggaacatat 1020

gatgcgaata ttaatattgc ggatgaaatg tttaataata aaattactta taactatagt 1080

tcgccaattg caggaattga taaaccaaat ggcgcgaaca tttcttctca aattattggt 1140

gtagatacag cttcaggtca aaacacatac aagcaaacag tatttgttaa ccctaagcaa 1200

cgagttttag gtaatacgtg ggtgtatatt aaaggctacc aagataaaat cgaagaaagt 1260

agcggtaaag taagtgctac agatacaaaa ctgagaattt ttgaagtgaa tgatatatct 1320

aaattatcag atagctacta tgcagatcca aatgactcta accttaaaga agtaacagac 1380

caatttaaaa atagaatcta ttatgagcat ccaaatgtag ctagtattaa atttggtgat 1440

attactaaaa catatgtagt attagtagaa gggcattacg acaatacagg taagaactta 1500

aaaactcagg ttattcaaga aaatgttgat cctgtaacaa atagagacta cagtattttc 1560

ggttggaata atgagaatgt tgtacgttat ggtggtggaa gtgctgatgg tgattcagca 1620

gtaaat 1626

<210> 28
<211> 542
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 28

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

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

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

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

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

Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn Val Asp Ser Thr
                85                  90                  95

Thr Lys Pro Met Ser Thr Gln Thr Ser Asn Thr Thr Thr Thr Glu Pro
            100                 105                 110

Ala Ser Thr Asn Glu Thr Pro Gln Pro Thr Ala Ile Lys Asn Gln Ala
        115                 120                 125

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

Gln Val Asp Asn Lys Thr Thr Asn Asp Ala Asn Ser Ile Ala Thr Asn
145                 150                 155                 160

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

Gln Thr Ile Ser Asn Ala Gln Gly Thr Ser Lys Pro Ser Val Arg Thr
            180                 185                 190

Arg Ala Val Arg Ser Leu Ala Val Ala Glu Pro Val Val Asn Ala Ala
        195                 200                 205

Asp Ala Lys Gly Thr Asn Val Asn Asp Lys Val Thr Ala Ser Asn Phe
    210                 215                 220

Lys Leu Glu Lys Thr Thr Phe Asp Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Phe
225                 230                 235                 240

Met Ala Ala Asn Phe Thr Val Thr Asp Lys Val Lys Ser Gly Asp Tyr
```

245 250 255

Phe Thr Ala Lys Leu Pro Asp Ser Leu Thr Gly Asn Gly Asp Val Asp
260 265 270

Tyr Ser Asn Ser Asn Asn Thr Met Pro Ile Ala Asp Ile Lys Ser Thr
275 280 285

Asn Gly Asp Val Val Ala Lys Ala Thr Tyr Asp Ile Leu Thr Lys Thr
290 295 300

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

Gly Gln Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
325 330 335

Ser Gly Thr Tyr Asp Ala Asn Ile Asn Ile Ala Asp Glu Met Phe Asn
340 345 350

Asn Lys Ile Thr Tyr Asn Tyr Ser Ser Pro Ile Ala Gly Ile Asp Lys
355 360 365

Pro Asn Gly Ala Asn Ile Ser Ser Gln Ile Ile Gly Val Asp Thr Ala
370 375 380

Ser Gly Gln Asn Thr Tyr Lys Gln Thr Val Phe Val Asn Pro Lys Gln
385 390 395 400

Arg Val Leu Gly Asn Thr Trp Val Tyr Ile Lys Gly Tyr Gln Asp Lys
405 410 415

Ile Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Ser Ala Thr Asp Thr Lys Leu Arg
420 425 430

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

Asp Pro Asn Asp Ser Asn Leu Lys Glu Val Thr Asp Gln Phe Lys Asn
450 455 460

Arg Ile Tyr Tyr Glu His Pro Asn Val Ala Ser Ile Lys Phe Gly Asp
465 470 475 480

Ile Thr Lys Thr Tyr Val Val Leu Val Glu Gly His Tyr Asp Asn Thr
485 490 495

Gly Lys Asn Leu Lys Thr Gln Val Ile Gln Glu Asn Val Asp Pro Val
500 505 510

Thr Asn Arg Asp Tyr Ser Ile Phe Gly Trp Asn Asn Glu Asn Val Val
515 520 525

Arg Tyr Gly Gly Gly Ser Ala Asp Gly Asp Ser Ala Val Asn
530 535 540

<210> 29
<211> 1626
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 29

ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aagcagaata agtattcgat tagacgtttt 60

acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaactatac tatttgggat aggcaatcat 120

caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacgcaat cttcgaaaaa taatgcaagt 180

gcagattccg aaaaaaacaa tatgatagaa acacctcaat taaatacaac ggctaatgat 240

acatctgata ttagtgcaaa cacaaacagt gcgaatgtag atagcacagc aaaaccaatg 300

tctacacaaa cgagcaatac cactacaaca gagccagctt caacaaatga aacacctcaa 360

ccgacggcaa ttaaagatca agcaactgct gcaaaaatgc aagatcaaac tgttcctcaa 420

gaagcaaatt ctcaagtaga taataaaaca acgaatgatg ctaatagcat agcgacaaac 480

agtgagctta aaaatcctca aacattagat ttaccacaat catcaccaca aacgatttcc 540

aatgcgcaaa gaactagtaa accaagtgtt agaacgagag ctgtacgtag tttagctgtt 600

gctgaaccgg tagtaaatgc tgctgatgct aaaggtacaa atgtaaatgg tcaagttacg 660

gcaagtgatt tcaagttaga aaagactaca tttgacccta accaaagtgg taacacattt 720

atggcggtaa attttaaagt ggcagggaaa gtgaaatcag gggattatta tacagcgaag 780

ttaccagata gtttaactgg taatggagac gtggattact ctaattcaaa taatacgatg 840

ccaattgcag atattaaaag tacgaatggc gatgttgtag ctaaagcaac atatgatatc 900

ttgactaaga cgtatacatt tgtctttaca gattatgtaa atgataaaga aaatattaac 960

ggacaatttt cattaccttt atttacagac cgagcaaagg cacctaaatc aggaacatac 1020

gatgcaaata ttaatattgc ggatgaaatg tttaataata aaattactta taactatagt 1080

tcgccaattg caggaattga taagccaaat ggcgcgaaca tttcttctca aattattggt 1140

gtagatacag cttcaggtca aaacacatac aagcaaacgg tatttgttaa ccctaagcaa 1200

cgagttttag gtaatacgtg ggtgtatatt aaaggttacc aagataaaat cgaagaaagt 1260

agcggtaaag taagtgctac agatacaaaa ctgagaattt ttgaagtgaa tgatacatct 1320

aaattatcag atagctacta tgcagatcca aatgactcta accttaaaga agtaacgaat 1380

gagtttaagg ataaaatcac ttataaatac caaaatgtag caagtattaa ttttggcgat 1440

attactaaaa cgtatgttgt attagtggaa ggtcactatg ataatactgg taaaaacttg 1500

aaaacacagg ttattcaaga aaatattgac ccagcgacag gtaaagacta cagtattttc 1560

ggttggaata atgagaatgt tgtacgttat ggtggtggaa gtgctgatgg tgattcagca 1620

gtaaat 1626

<210> 30
<211> 542
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 30

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

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

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

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

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

Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn Val Asp Ser Thr
                85                  90                  95

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

Ala Ser Thr Asn Glu Thr Pro Gln Pro Thr Ala Ile Lys Asp Gln Ala
        115                 120                 125

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

Gln Val Asp Asn Lys Thr Thr Asn Asp Ala Asn Ser Ile Ala Thr Asn
145                 150                 155                 160

Ser Glu Leu Lys Asn Pro Gln Thr Leu Asp Leu Pro Gln Ser Ser Pro
                165                 170                 175
```

```
Gln Thr Ile Ser Asn Ala Gln Arg Thr Ser Lys Pro Ser Val Arg Thr
            180                 185                 190

Arg Ala Val Arg Ser Leu Ala Val Ala Glu Pro Val Val Asn Ala Ala
        195                 200                 205

Asp Ala Lys Gly Thr Asn Val Asn Gly Gln Val Thr Ala Ser Asp Phe
    210                 215                 220

Lys Leu Glu Lys Thr Thr Phe Asp Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Phe
225                 230                 235                 240

Met Ala Val Asn Phe Lys Val Ala Gly Lys Val Lys Ser Gly Asp Tyr
                245                 250                 255

Tyr Thr Ala Lys Leu Pro Asp Ser Leu Thr Gly Asn Gly Asp Val Asp
            260                 265                 270

Tyr Ser Asn Ser Asn Asn Thr Met Pro Ile Ala Asp Ile Lys Ser Thr
        275                 280                 285

Asn Gly Asp Val Val Ala Lys Ala Thr Tyr Asp Ile Leu Thr Lys Thr
    290                 295                 300

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

Gly Gln Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
                325                 330                 335

Ser Gly Thr Tyr Asp Ala Asn Ile Asn Ile Ala Asp Glu Met Phe Asn
            340                 345                 350

Asn Lys Ile Thr Tyr Asn Tyr Ser Ser Pro Ile Ala Gly Ile Asp Lys
        355                 360                 365

Pro Asn Gly Ala Asn Ile Ser Ser Gln Ile Ile Gly Val Asp Thr Ala
    370                 375                 380

Ser Gly Gln Asn Thr Tyr Lys Gln Thr Val Phe Val Asn Pro Lys Gln
385                 390                 395                 400

Arg Val Leu Gly Asn Thr Trp Val Tyr Ile Lys Gly Tyr Gln Asp Lys
                405                 410                 415

Ile Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Ser Ala Thr Asp Thr Lys Leu Arg
            420                 425                 430
```

```
Ile Phe Glu Val Asn Asp Thr Ser Lys Leu Ser Asp Ser Tyr Tyr Ala
        435                 440                 445

Asp Pro Asn Asp Ser Asn Leu Lys Glu Val Thr Asn Glu Phe Lys Asp
    450                 455                 460

Lys Ile Thr Tyr Lys Tyr Gln Asn Val Ala Ser Ile Asn Phe Gly Asp
465                 470                 475                 480

Ile Thr Lys Thr Tyr Val Val Leu Val Glu Gly His Tyr Asp Asn Thr
                485                 490                 495

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

Thr Gly Lys Asp Tyr Ser Ile Phe Gly Trp Asn Asn Glu Asn Val Val
        515                 520                 525

Arg Tyr Gly Gly Gly Ser Ala Asp Gly Asp Ser Ala Val Asn
    530                 535                 540
```

<210> 31
<211> 1626
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 31

ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aagcagaata agtattcgat tagacgtttt 60

acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaactatac tatttgggat aggcaatcat 120

caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacgcaat cttcgaaaaa taatgcaagt 180

gcagattccg aaaaaaacaa tatgatagaa acacctcaat taaatacaac ggctaatgat 240

acatctgata ttagtgcaaa cacaaacagt gcgaatgtag atagcacagc aaaaccaatg 300

tctacacaaa cgagcaatac cactacaaca gagccagctt caacaaatga aacacctcaa 360

ctgacggcaa ttaaagatca agcaactgct gcaaaaatgc aagatcaaac tgttcctcaa 420

gaagcaaatt ctcaagtaga taataaaaca acgaatgatg ctaatagcat agcgacaaac 480

agtgagctta aaaatcctca aacattagat ttaccacaat catcaccaca aacaatttcc 540

aatgcgcaag gaactagtaa accaagtgtt agaacgagag ctgtacgtag tcttgcagtt 600

gctgaacctg tagtaaatgc tgctgatgct aaaggtacaa atgtaaatga taaagttacg 660

gcaaaagatt ttcaattaga aaagactaca tttgacccta accaaagtgg taatactttt 720

atggcggcaa actttacagt gactggacaa gtgaaatcag gggattattt tacagcgaag 780

ttaccagata gtgtaactgg taatggagac gtggattact ctaattcgaa taatacgatg 840

ccaattgcag atatagtaaa cgataaaaat gaagttgtag caaaagcgac atatgatatt 900

ttgactaaga catatacatt tgtctttaca gattatgtaa atgataagca aaatattaat 960

gggaaatttt cattaccact atttacagac agagcaaagg cacctaaatc aggaacatat 1020

gatgcaaata ttaatattgc ggatgaaatg tttaataata aaattactta taactatagt 1080

tcgccaattg caggaattga taagccaaat ggcgcgaaca tttcttctca aattattggt 1140

gtagatacag cttcaggtca aaatacatac aagcaaacgg tatttgttaa ccctaagcaa 1200

cgagttttag gtaatacgtg ggtgtatatt aaaggttacc aagataaaat cgaagaaagt 1260

agcggtaaag taagtgctac agatacaaaa ctgagaattt ttgaagtgaa tgatacatct 1320

aaattatcag atagctacta tgcagaccca aatgactcta atcttaaaga agtaactgat 1380

caatttaagg ataaaatcac ttataaatac caaaatgtag caagtattaa ttttggtgat 1440

ataaataaaa cgtatgtcgt tttagtcgaa ggtcattatg ataaaacagg taaaaacttg 1500

aaaacgcaag tcattcaaga aaatgttgac ccagcgacag gtaaagacta cagtattttc 1560

ggttggaata atgagaatgt tgtacgttat ggtggtggaa gtgctgatgg tgattcagca 1620

gtaaat 1626

<210> 32
<211> 542
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 32

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

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

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

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

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

Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn Val Asp Ser Thr
                85                  90                  95

Ala Lys Pro Met Ser Thr Gln Thr Ser Asn Thr Thr Thr Thr Glu Pro
            100                 105                 110
```

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

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

Gln Val Asp Asn Lys Thr Thr Asn Asp Ala Asn Ser Ile Ala Thr Asn
145                 150                 155                 160

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

Gln Thr Ile Ser Asn Ala Gln Gly Thr Ser Lys Pro Ser Val Arg Thr
            180                 185                 190

Arg Ala Val Arg Ser Leu Ala Val Ala Glu Pro Val Val Asn Ala Ala
        195                 200                 205

Asp Ala Lys Gly Thr Asn Val Asn Asp Lys Val Thr Ala Lys Asp Phe
    210                 215                 220

Gln Leu Glu Lys Thr Thr Phe Asp Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Phe
225                 230                 235                 240

Met Ala Ala Asn Phe Thr Val Thr Gly Gln Val Lys Ser Gly Asp Tyr
                245                 250                 255

Phe Thr Ala Lys Leu Pro Asp Ser Val Thr Gly Asn Gly Asp Val Asp
            260                 265                 270

Tyr Ser Asn Ser Asn Asn Thr Met Pro Ile Ala Asp Ile Val Asn Asp
        275                 280                 285

Lys Asn Glu Val Val Ala Lys Ala Thr Tyr Asp Ile Leu Thr Lys Thr
    290                 295                 300

Tyr Thr Phe Val Phe Thr Asp Tyr Val Asn Asp Lys Gln Asn Ile Asn
305                 310                 315                 320

Gly Lys Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
                325                 330                 335

Ser Gly Thr Tyr Asp Ala Asn Ile Asn Ile Ala Asp Glu Met Phe Asn
            340                 345                 350

Asn Lys Ile Thr Tyr Asn Tyr Ser Ser Pro Ile Ala Gly Ile Asp Lys
        355                 360                 365
```

```
Pro Asn Gly Ala Asn Ile Ser Ser Gln Ile Ile Gly Val Asp Thr Ala
    370                 375                 380

Ser Gly Gln Asn Thr Tyr Lys Gln Thr Val Phe Val Asn Pro Lys Gln
385                 390                 395                 400

Arg Val Leu Gly Asn Thr Trp Val Tyr Ile Lys Gly Tyr Gln Asp Lys
                405                 410                 415

Ile Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Ser Ala Thr Asp Thr Lys Leu Arg
            420                 425                 430

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

Asp Pro Asn Asp Ser Asn Leu Lys Glu Val Thr Asp Gln Phe Lys Asp
    450                 455                 460

Lys Ile Thr Tyr Lys Tyr Gln Asn Val Ala Ser Ile Asn Phe Gly Asp
465                 470                 475                 480

Ile Asn Lys Thr Tyr Val Val Leu Val Glu Gly His Tyr Asp Lys Thr
                485                 490                 495

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

Thr Gly Lys Asp Tyr Ser Ile Phe Gly Trp Asn Asn Glu Asn Val Val
        515                 520                 525

Arg Tyr Gly Gly Gly Ser Ala Asp Gly Asp Ser Ala Val Asn
    530                 535                 540
```

<210> 33
<211> 1626
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 33

ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aagcagaata agtattcgat tagacgtttt 60

acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaactatac tatttgggat aggcaatcat 120

caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacgcaat cttcgaaaaa taatgcaagt 180

gcagattccg aaaaaaacaa tatgatagaa acacctcaat taaatacaac ggctaatgat 240

acatctgata ttagtgcaaa cacaaacagt gcgaatgtag atagcacagc aaaaccaatg 300

tctacacaaa cgagcaatac cactacaaca gagccagctt caacaaatga aacacctcaa 360

ctgacggcaa ttaaagatca agcaactgct gcaaaaatgc aagatcaaac tgttcctcaa 420

gaagcaaatt ctcaagtaga taataaaaca acgaatgatg ctaatagcat agcgacaaac 480

agtgagctta aaaatcctca aacattagat ttaccacaat catcaccaca aacaatttcc 540

aatgcgcaag gaactagtaa accaagtgtt agaacgagag ctgtacgtag tcttgcagtt 600

gctgaacctg tagtaaatgc tgctgatgct aaaggtacaa atgtaaatga taaagttacg 660

gcaaaagatt ttcaattaga aaagactaca tttgacccta accaaagtgg taatactttt 720

atggcggcaa actttacagt gactggacaa gtgaaatcag gggattattt tacagcgaag 780

ttaccagata gtgtaactgg taatggagac gtggattact ctaattcgaa taatacgatg 840

ccaattgcag atattaaaag cacgaatggt gatgttgtag ctaaagcaac atatgatatc 900

ttgactaaga catatacatt tgtctttaca gattatgtaa atgaaaaaga aaatattaac 960

ggacaatttt cattaccttt atttacagac agagcaaagg cacctaaatc aggaacatac 1020

gatgcaaata ttaatattgc ggatgaaatg tttgataata aaattactta taactatagt 1080

tcgcctattg caggaattga taaaccaaat ggcgcaaata tttcttctca aattattggt 1140

gtagatacag cttcaggtca aaacacatac aagcaaacag tatttgttaa ccctaagcaa 1200

cgagttttag gtaatacgtg ggtgtatatt aaaggttacc aagataaaat cgaagaaagt 1260

agcggtaaag taagtgctac agatacaaaa ctgagaattt ttgaagtgaa tgatacatct 1320

aaattatcag atagctacta tgcggaccca aatgactcta accttaaaga agtaacgaat 1380

gaatttaagg ataaaatcac ttataaatac caaaatgtag caagtattaa ttttggcgat 1440

attactaaaa cgtatgttgt attagtggaa ggtcactatg ataatactgg taaaaacttg 1500

aaaacacagg ttattcaaga aaatattgac ccagcgacag gtaaagacta cagtattttc 1560

ggttggaata atgagaatgt tgtacgttat ggtggtggaa gtgctgatgg tgattcagca 1620

gtaaat 1626

<210> 34
<211> 542
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 34

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

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

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

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

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

Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn Val Asp Ser Thr
                85                  90                  95

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

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

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

Gln Val Asp Asn Lys Thr Thr Asn Asp Ala Asn Ser Ile Ala Thr Asn
145                 150                 155                 160

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

Gln Thr Ile Ser Asn Ala Gln Gly Thr Ser Lys Pro Ser Val Arg Thr
            180                 185                 190

Arg Ala Val Arg Ser Leu Ala Val Ala Glu Pro Val Val Asn Ala Ala
        195                 200                 205

Asp Ala Lys Gly Thr Asn Val Asn Asp Lys Val Thr Ala Lys Asp Phe
    210                 215                 220

Gln Leu Glu Lys Thr Thr Phe Asp Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Phe
225                 230                 235                 240

Met Ala Ala Asn Phe Thr Val Thr Gly Gln Val Lys Ser Gly Asp Tyr
                245                 250                 255

Phe Thr Ala Lys Leu Pro Asp Ser Val Thr Gly Asn Gly Asp Val Asp
            260                 265                 270

Tyr Ser Asn Ser Asn Asn Thr Met Pro Ile Ala Asp Ile Lys Ser Thr
        275                 280                 285

Asn Gly Asp Val Val Ala Lys Ala Thr Tyr Asp Ile Leu Thr Lys Thr
```

```
    290                 295                 300

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

Gly Gln Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
                325                 330                 335

Ser Gly Thr Tyr Asp Ala Asn Ile Asn Ile Ala Asp Glu Met Phe Asp
            340                 345                 350

Asn Lys Ile Thr Tyr Asn Tyr Ser Ser Pro Ile Ala Gly Ile Asp Lys
        355                 360                 365

Pro Asn Gly Ala Asn Ile Ser Ser Gln Ile Ile Gly Val Asp Thr Ala
    370                 375                 380

Ser Gly Gln Asn Thr Tyr Lys Gln Thr Val Phe Val Asn Pro Lys Gln
385                 390                 395                 400

Arg Val Leu Gly Asn Thr Trp Val Tyr Ile Lys Gly Tyr Gln Asp Lys
                405                 410                 415

Ile Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Ser Ala Thr Asp Thr Lys Leu Arg
            420                 425                 430

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

Asp Pro Asn Asp Ser Asn Leu Lys Glu Val Thr Asn Glu Phe Lys Asp
    450                 455                 460

Lys Ile Thr Tyr Lys Tyr Gln Asn Val Ala Ser Ile Asn Phe Gly Asp
465                 470                 475                 480

Ile Thr Lys Thr Tyr Val Val Leu Val Glu Gly His Tyr Asp Asn Thr
                485                 490                 495

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

Thr Gly Lys Asp Tyr Ser Ile Phe Gly Trp Asn Asn Glu Asn Val Val
        515                 520                 525

Arg Tyr Gly Gly Gly Ser Ala Asp Gly Asp Ser Ala Val Asn
    530                 535                 540
```

<210> 35

<211> 1626
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 35

```
ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aagcagaata agtattcgat tagacgtttt      60
acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaactatac tatttgggat aggcaatcat     120
caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacgcaat cttcgaaaaa taatgcaagt     180
gcagattccg aaaaaaataa tatgatagaa acacctcaat taaatacaac ggctaatgat     240
acatctgata ttagtgcaaa cacaaacagt gcgaatgtag atagcacagc aaaaccaatg     300
tctacacaaa cgagcaatac cactacaaca gagccagctt caacaaatga aacacctcaa     360
ccgacggcaa ttaaagatca agcaactgct gcaaaaatgc aagatcaaac tgttcctcaa     420
gaagcaaatt ctcaagtaga taataaaaca acgaatgatg ctaatagcat agcaacaaac     480
agtgaactta aaaatcctca aacattagat ttaccacaat catcaccaca aacgatttcc     540
aatgcgcaag gaactagtaa accaagtgtt agaacgagag ctgtacgtag tcttgcagtt     600
gctgaacctg tagtaaatgc tgctgatgct aaaggtacaa atgtaaatga taaagttacg     660
gcaagtaatc tacagttgca aaagactaca tttgacccta accaaagtgg aaatacattt     720
atggcggcaa attttacagt gacagataaa gtgaaatcag gggattattt tacagcgaag     780
ttaccagata gtttaactgg taatggagac gtggattact ctaattcaaa taatacgatg     840
ccaattgcag atattaaaag tacgaatggc gatgttgtag ctaaagcaac atatgatatc     900
ttgactaaga cgtatacatt tgtctttaca gattatgtaa atgataaaga aaatattaac     960
gggcaatttt cattaccttt atttacagac cgagcaaagg cacctaaatc aggaacatat    1020
gatgcaaata ttaatattgc ggatgaaatg tttaataata aaattactta taactatagt    1080
tcgccaattg caggaattga taagccaaat ggcgcgaaca tttcttctca aattattggt    1140
gtagatacag cttcaggtca aaacacatac aagcaaacgg tatttgttaa ccctaagcaa    1200
cgagttttag gtaatacgtg ggtgtatatt aaaggttacc aagataaaat cgaagaaagt    1260
agcggtaaag taagtgctac agatacaaaa ctgagaattt ttgaagtgaa tgatacatct    1320
aaattatcag atagctacta tgcagaccca aatgactcta accttaaaga agtaactgat    1380
caatttaagg ataaaatcac ttataaatac caaaacgtag caagtattaa ttttggtgat    1440
ataaataaaa cgtatgtcgt tttagttgaa ggtcactatg ataatactgg aaaaaacttg    1500
aaaacacagg ttattcaaga aaatattgac ccagcgacag gtaaagacta cagtattttc    1560
ggatggaata atgagaatgt tgtacgttat ggtggtggaa gtgctgatgg tgattcagca    1620
gtaaat                                                              1626
```

<210> 36

<211> 542
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 36

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

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

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

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

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

Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn Val Asp Ser Thr
                85                  90                  95

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

Ala Ser Thr Asn Glu Thr Pro Gln Pro Thr Ala Ile Lys Asp Gln Ala
        115                 120                 125

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

Gln Val Asp Asn Lys Thr Thr Asn Asp Ala Asn Ser Ile Ala Thr Asn
145                 150                 155                 160

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

Gln Thr Ile Ser Asn Ala Gln Gly Thr Ser Lys Pro Ser Val Arg Thr
            180                 185                 190

Arg Ala Val Arg Ser Leu Ala Val Ala Glu Pro Val Val Asn Ala Ala
        195                 200                 205

Asp Ala Lys Gly Thr Asn Val Asn Asp Lys Val Thr Ala Ser Asn Leu
    210                 215                 220
```

```
Gln Leu Gln Lys Thr Thr Phe Asp Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Phe
225                 230                 235                 240

Met Ala Ala Asn Phe Thr Val Thr Asp Lys Val Lys Ser Gly Asp Tyr
                245                 250                 255

Phe Thr Ala Lys Leu Pro Asp Ser Leu Thr Gly Asn Gly Asp Val Asp
            260                 265                 270

Tyr Ser Asn Ser Asn Asn Thr Met Pro Ile Ala Asp Ile Lys Ser Thr
        275                 280                 285

Asn Gly Asp Val Val Ala Lys Ala Thr Tyr Asp Ile Leu Thr Lys Thr
    290                 295                 300

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

Gly Gln Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
                325                 330                 335

Ser Gly Thr Tyr Asp Ala Asn Ile Asn Ile Ala Asp Glu Met Phe Asn
            340                 345                 350

Asn Lys Ile Thr Tyr Asn Tyr Ser Ser Pro Ile Ala Gly Ile Asp Lys
        355                 360                 365

Pro Asn Gly Ala Asn Ile Ser Ser Gln Ile Ile Gly Val Asp Thr Ala
    370                 375                 380

Ser Gly Gln Asn Thr Tyr Lys Gln Thr Val Phe Val Asn Pro Lys Gln
385                 390                 395                 400

Arg Val Leu Gly Asn Thr Trp Val Tyr Ile Lys Gly Tyr Gln Asp Lys
                405                 410                 415

Ile Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Ser Ala Thr Asp Thr Lys Leu Arg
            420                 425                 430

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

Asp Pro Asn Asp Ser Asn Leu Lys Glu Val Thr Asp Gln Phe Lys Asp
    450                 455                 460

Lys Ile Thr Tyr Lys Tyr Gln Asn Val Ala Ser Ile Asn Phe Gly Asp
465                 470                 475                 480
```

```
Ile Asn Lys Thr Tyr Val Val Leu Val Glu Gly His Tyr Asp Asn Thr
                485                 490                 495

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

Thr Gly Lys Asp Tyr Ser Ile Phe Gly Trp Asn Asn Glu Asn Val Val
        515                 520                 525

Arg Tyr Gly Gly Gly Ser Ala Asp Gly Asp Ser Ala Val Asn
    530                 535                 540
```

<210> 37
<211> 1626
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 37

ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aagcagaata agtattcgat tagacgtttt 60

acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaactatac tatttgggat aggcaatcat 120

caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacgcaat cttcgaaaaa taatgcaagt 180

gcagattccg aaaaaaacaa tatgatagaa acacctcaat taaatacaac ggctaatgat 240

acatctgata ttagtgcaaa cacaaacagt gcgaatgtag atagcacaac aaaaccaatg 300

tctacacaaa cgagcaatac cactacaaca gagccagctt caacaaatga aacacctcaa 360

ccgacggcaa ttaaagatca agcaactgct gcaaaaatgc aagatcaaac tgttcctcaa 420

gaagcaaatt ctcaagtaga taataaaaca acgaatgatg ctaatagcat agcgacaaac 480

agtgagctta aaaatcctca aacattagat ttaccacaat catcaccaca aacaatttcc 540

aatgcgcaag gaactagtaa accaagtgtt agaacgagag ctgtacgtag tcttgcagtt 600

gctgaacctg tagtaaatgc tgctgatgct aaaggtacaa atgtaaatga taaagttacg 660

gcaaaagatt ttcaattaga aaagactaca tttgacccta accaaagtgg taatactttt 720

atggcggcaa actttacagt gactggacaa gtgaaatcag gggattattt tacagcgaag 780

ttaccagata gtgtaactgg taatggagac gtggattact ctaattcgaa taatacgatg 840

ccaattgcag atattaaaag cacgaatggt gatgttgtag ctaaagcaac atatgatatc 900

ttgactaaga catatacatt tgtctttaca gattatgtaa atgaaaaaga aaatattaac 960

ggacaatttt cattaccttt atttacagac agagcaaagg cacctaaatc aggaacatac 1020

gatgcaaata ttaatattgc ggatgaaatg tttgataata aaattactta taactatagt 1080

tcgcctattg caggaattga taaaccaaat ggcgcaaata tttcttctca aattattggt 1140

gtagatacag cttcaggtca aaacacatac aagcaaacag tatttgttaa ccctaagcaa 1200

cgagttttag gtaatacgtg ggtgtatatt aaaggttacc aagataaaat cgaagaaagt 1260

agcggtaaag taagtgctac agatacaaaa ctgagaattt ttgaagtgaa tgatacatct 1320

aaattatcag atagctacta tgcggaccca aatgactcta accttaaaga agtaacgaat 1380

gaatttaagg ataaaatcac ttataaatac caaaatgtag caagtattaa ttttggcgat 1440

attactaaaa cgtatgttgt attagtggaa ggtcactatg ataatactgg taaaaacttg 1500

aaaacacagg ttattcaaga aaatattgac ccagcgacag gtaaagacta cagtattttc 1560

ggttggaata atgagaatgt tgtacgttat ggtggtggaa gtgctgatgg tgattcagca 1620

gtaaat 1626

<210> 38
<211> 542
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 38

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

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

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

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

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

Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn Val Asp Ser Thr
                85                  90                  95

Thr Lys Pro Met Ser Thr Gln Thr Ser Asn Thr Thr Thr Thr Glu Pro
            100                 105                 110

Ala Ser Thr Asn Glu Thr Pro Gln Pro Thr Ala Ile Lys Asp Gln Ala
        115                 120                 125

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

Gln Val Asp Asn Lys Thr Thr Asn Asp Ala Asn Ser Ile Ala Thr Asn
145                 150                 155                 160
```

```
Ser Glu Leu Lys Asn Pro Gln Thr Leu Asp Leu Pro Gln Ser Ser Pro
                165                 170                 175

Gln Thr Ile Ser Asn Ala Gln Gly Thr Ser Lys Pro Ser Val Arg Thr
            180                 185                 190

Arg Ala Val Arg Ser Leu Ala Val Ala Glu Pro Val Val Asn Ala Ala
        195                 200                 205

Asp Ala Lys Gly Thr Asn Val Asn Asp Lys Val Thr Ala Lys Asp Phe
    210                 215                 220

Gln Leu Glu Lys Thr Thr Phe Asp Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Phe
225                 230                 235                 240

Met Ala Ala Asn Phe Thr Val Thr Gly Gln Val Lys Ser Gly Asp Tyr
                245                 250                 255

Phe Thr Ala Lys Leu Pro Asp Ser Val Thr Gly Asn Gly Asp Val Asp
            260                 265                 270

Tyr Ser Asn Ser Asn Asn Thr Met Pro Ile Ala Asp Ile Lys Ser Thr
        275                 280                 285

Asn Gly Asp Val Val Ala Lys Ala Thr Tyr Asp Ile Leu Thr Lys Thr
    290                 295                 300

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

Gly Gln Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
                325                 330                 335

Ser Gly Thr Tyr Asp Ala Asn Ile Asn Ile Ala Asp Glu Met Phe Asp
            340                 345                 350

Asn Lys Ile Thr Tyr Asn Tyr Ser Ser Pro Ile Ala Gly Ile Asp Lys
        355                 360                 365

Pro Asn Gly Ala Asn Ile Ser Ser Gln Ile Ile Gly Val Asp Thr Ala
    370                 375                 380

Ser Gly Gln Asn Thr Tyr Lys Gln Thr Val Phe Val Asn Pro Lys Gln
385                 390                 395                 400

Arg Val Leu Gly Asn Thr Trp Val Tyr Ile Lys Gly Tyr Gln Asp Lys
                405                 410                 415
```

```
Ile Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Ser Ala Thr Asp Thr Lys Leu Arg
            420                 425                 430

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

Asp Pro Asn Asp Ser Asn Leu Lys Glu Val Thr Asn Glu Phe Lys Asp
    450                 455                 460

Lys Ile Thr Tyr Lys Tyr Gln Asn Val Ala Ser Ile Asn Phe Gly Asp
465                 470                 475                 480

Ile Thr Lys Thr Tyr Val Val Leu Val Glu Gly His Tyr Asp Asn Thr
                485                 490                 495

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

Thr Gly Lys Asp Tyr Ser Ile Phe Gly Trp Asn Asn Glu Asn Val Val
        515                 520                 525

Arg Tyr Gly Gly Gly Ser Ala Asp Gly Asp Ser Ala Val Asn
    530                 535                 540
```

<210> 39
<211> 1626
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 39

ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aagcagaata agtattcgat tagacgtttt 60

acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaactatac tatttgggat aggcaatcat 120

caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacacaat cttcgaaaaa taatgcaagt 180

gcagattccg aaaaaaacaa tatgatagaa acacctcaat taaatacaac ggctaatgat 240

acatctgata ttagtgcaaa cacaaacagt gcgaatgtag atagcacagc aaaaccaatg 300

tctacacaaa cgagcaatac cactacaaca gagccagctt caacaaatga aacacctcaa 360

ccgacggcaa ttaaagatca agcaactgct gcaaaaatgc aagatcaaac tgttcctcaa 420

gaagcaaatt ctcaagtaga taataaaaca acgaatgatg ctaatagcat agcaacaaac 480

agtgagctta aaaatcctca aacattagat ttaccacaat catcaccaca aacgatttcc 540

aatgcgcaag gaactagtaa accgagtgtt agaacgagag ctgtacgtag tcttgcagtt 600

gctgaacctg tagtaaatgc tgctgatgct aaaggtacaa atgtaaatgg tcaagttacg 660

gcaagtgatt tcaagttaga aaagactaca tttgacccta accaaagtgg taacacattt 720

atggcggcaa aatttacagt gactggacaa gtgaaagcag gggattattt tacagcgaag 780

ttaccagata gtgtaaatgg taatggagat gtggattact ctaattcaaa taatacgatg 840

ccaattgcag atattaaaag tacgaatggc gatgttgtag ctaaagcaac atatgatatc 900

ttgactaaga cgtatacatt tgtctttaca gattatgtaa ataataaaga aaatattaac 960

ggacaatttt cattaccttt atttacagac cgagcaaagg cacctaaatc aggaacatat 1020

gatgcgaata ttaatattgc ggatgaaatg tttaataata aaattactta taactatagt 1080

tcgccaattg caggaattga taaaccaaat ggcgcgaaca tttcttctca aattattggt 1140

gtagatacag cttcaggtca aaacacatac aagcaaacag tatatgttaa ccctaagcaa 1200

cgagttttag gtaatacgtg ggtgtatatt aaaggttacc aagataaaat cgaagaaagt 1260

agcggtaaag taagtgctac agatacaaaa ctgagaattt ttgaagtgaa tgatacatct 1320

aaattatcag atagctacta tgcagaccca aatgattcga atcttaaaga agtaacgaat 1380

gagtttaagg ataaaatcac ttataaatac caaaatgtag caagtattaa ttttggcgat 1440

attactaaaa cgtatgttgt attagtggaa ggtcactatg ataatactgg taaaaacttg 1500

aaaacacagg ttattcaaga aaatattgac ccagcgacag gtaaagacta cagtattttc 1560

ggttggaata atgagaatgt tgtacgttat ggtggtggaa gtgctgatgg tgattcagca 1620

gtaaat 1626

<210> 40
<211> 542
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 40

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

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

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

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

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

Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn Val Asp Ser Thr
                85                  90                  95
```

```
Ala Lys Pro Met Ser Thr Gln Thr Ser Asn Thr Thr Thr Thr Glu Pro
            100                 105                 110

Ala Ser Thr Asn Glu Thr Pro Gln Pro Thr Ala Ile Lys Asp Gln Ala
        115                 120                 125

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

Gln Val Asp Asn Lys Thr Thr Asn Asp Ala Asn Ser Ile Ala Thr Asn
145                 150                 155                 160

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

Gln Thr Ile Ser Asn Ala Gln Gly Thr Ser Lys Pro Ser Val Arg Thr
            180                 185                 190

Arg Ala Val Arg Ser Leu Ala Val Ala Glu Pro Val Val Asn Ala Ala
        195                 200                 205

Asp Ala Lys Gly Thr Asn Val Asn Gly Gln Val Thr Ala Ser Asp Phe
    210                 215                 220

Lys Leu Glu Lys Thr Thr Phe Asp Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Phe
225                 230                 235                 240

Met Ala Ala Lys Phe Thr Val Thr Gly Gln Val Lys Ala Gly Asp Tyr
                245                 250                 255

Phe Thr Ala Lys Leu Pro Asp Ser Val Asn Gly Asn Gly Asp Val Asp
            260                 265                 270

Tyr Ser Asn Ser Asn Asn Thr Met Pro Ile Ala Asp Ile Lys Ser Thr
        275                 280                 285

Asn Gly Asp Val Val Ala Lys Ala Thr Tyr Asp Ile Leu Thr Lys Thr
    290                 295                 300

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

Gly Gln Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
                325                 330                 335

Ser Gly Thr Tyr Asp Ala Asn Ile Asn Ile Ala Asp Glu Met Phe Asn
```

```
                340                 345                 350

Asn Lys Ile Thr Tyr Asn Tyr Ser Ser Pro Ile Ala Gly Ile Asp Lys
        355                 360                 365

Pro Asn Gly Ala Asn Ile Ser Ser Gln Ile Ile Gly Val Asp Thr Ala
    370                 375                 380

Ser Gly Gln Asn Thr Tyr Lys Gln Thr Val Tyr Val Asn Pro Lys Gln
385                 390                 395                 400

Arg Val Leu Gly Asn Thr Trp Val Tyr Ile Lys Gly Tyr Gln Asp Lys
                405                 410                 415

Ile Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Ser Ala Thr Asp Thr Lys Leu Arg
            420                 425                 430

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

Asp Pro Asn Asp Ser Asn Leu Lys Glu Val Thr Asn Glu Phe Lys Asp
    450                 455                 460

Lys Ile Thr Tyr Lys Tyr Gln Asn Val Ala Ser Ile Asn Phe Gly Asp
465                 470                 475                 480

Ile Thr Lys Thr Tyr Val Val Leu Val Glu Gly His Tyr Asp Asn Thr
                485                 490                 495

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

Thr Gly Lys Asp Tyr Ser Ile Phe Gly Trp Asn Asn Glu Asn Val Val
        515                 520                 525

Arg Tyr Gly Gly Gly Ser Ala Asp Gly Asp Ser Ala Val Asn
    530                 535                 540
```

<210> 41
<211> 1626
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 41

ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aggcagaata agtattcgat tagacgtttt 60

acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaactatac tatttgggat aggcaatcat 120

caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacgcaat cttcgaaaaa taatgcaagt 180

gcagattccg aaaaaaacaa tatgatagaa acacctcaat taaatacaac ggctaatgat 240

acatctgata ttagtgcaaa cacaaacagt gcgaatgtag atagcacaac aaaaccaatg 300

tctacacaaa cgagcaatac cactacaaca gagccagctt caacaaatga aacacctcaa 360

ccgacggcaa ttaaaaatca agcaactgct gcaaaaatgc aagatcaaac tgttcctcaa 420

gaagcaaatt ctcaagtaga taataaaaca acgaatgatg ctaatagcat agcaacaaac 480

agtgagctta aaaattctca aacattagat ttaccacaat catcaccaca aacgatttcc 540

aatgcgcaag gaactagtaa accaagtgtt agaacgagag ctgtacgtag tttagctgtt 600

gctgaaccgg tagtaaatgc tgctgatgct aaaggtacaa atgtaaatga taaagttacg 660

gcaagtaatt tcaagttaga aaagactaca tttgacccta atcaaagtgg taacacattt 720

atggcggcaa attttacagt gacagataaa gtgaaatcag gggattattt tacagcgaag 780

ttaccagata gtttaactgg taatggagac gtggattatt ctaattcaaa taatacgatg 840

ccaattgcag acattaaaag tacgaatggc gatgttgtag ctaaagcaac atatgatatc 900

ttgactaaga cgtatacatt tgtctttaca gattatgtaa ataataaaga aaatattaac 960

ggacaatttt cattaccttt atttacagac cgagcaaagg cacctaaatc aggaacatat 1020

gatgcgaata ttaatattgc ggatgaaatg tttaataata aaattactta taactatagt 1080

tcgccaattg caggaattga taaaccaaat ggcgcgaaca tttcttctca aattattggt 1140

gtagatacag cttcaggtca aaacacatac aagcaaacag tatttgttaa ccctaagcaa 1200

cgagttttag gtaatacgtg ggtgtatatt aaaggctacc aagataaaat cgaagaaagt 1260

agcggtaaag taagtgctac agatacaaaa ctgagaattt ttgaagtgaa tgatacatct 1320

aaattatcag atagctacta tgcagatcca aatgactcta accttaaaga agtaacagac 1380

caatttaaaa atagaatcta ttatgagcat ccaaatgtag ctagtattaa atttggtgat 1440

attactaaaa catatgtagt attagtagaa gggcattacg acaatacagg taagaactta 1500

aaaactcagg ttattcaaga aaatgttgat cctgtaacaa atagagacta cagtattttc 1560

ggttggaata atgagaatgt tgtacgttat ggtggtggaa gtgctgatgg tgattcagca 1620

gtaaat 1626

<210> 42
<211> 542
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 42

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

Ile Arg Arg Phe Thr Val Gly Thr Thr Ser Val Ile Val Gly Ala Thr
```

```
            20                  25                  30

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

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

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

Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn Val Asp Ser Thr
                85                  90                  95

Thr Lys Pro Met Ser Thr Gln Thr Ser Asn Thr Thr Thr Thr Glu Pro
            100                 105                 110

Ala Ser Thr Asn Glu Thr Pro Gln Pro Thr Ala Ile Lys Asn Gln Ala
        115                 120                 125

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

Gln Val Asp Asn Lys Thr Thr Asn Asp Ala Asn Ser Ile Ala Thr Asn
145                 150                 155                 160

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

Gln Thr Ile Ser Asn Ala Gln Gly Thr Ser Lys Pro Ser Val Arg Thr
            180                 185                 190

Arg Ala Val Arg Ser Leu Ala Val Ala Glu Pro Val Val Asn Ala Ala
        195                 200                 205

Asp Ala Lys Gly Thr Asn Val Asn Asp Lys Val Thr Ala Ser Asn Phe
    210                 215                 220

Lys Leu Glu Lys Thr Thr Phe Asp Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Phe
225                 230                 235                 240

Met Ala Ala Asn Phe Thr Val Thr Asp Lys Val Lys Ser Gly Asp Tyr
                245                 250                 255

Phe Thr Ala Lys Leu Pro Asp Ser Leu Thr Gly Asn Gly Asp Val Asp
            260                 265                 270
```

```
Tyr Ser Asn Ser Asn Asn Thr Met Pro Ile Ala Asp Ile Lys Ser Thr
        275                 280                 285

Asn Gly Asp Val Val Ala Lys Ala Thr Tyr Asp Ile Leu Thr Lys Thr
    290                 295                 300

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

Gly Gln Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
                325                 330                 335

Ser Gly Thr Tyr Asp Ala Asn Ile Asn Ile Ala Asp Glu Met Phe Asn
            340                 345                 350

Asn Lys Ile Thr Tyr Asn Tyr Ser Ser Pro Ile Ala Gly Ile Asp Lys
        355                 360                 365

Pro Asn Gly Ala Asn Ile Ser Ser Gln Ile Ile Gly Val Asp Thr Ala
    370                 375                 380

Ser Gly Gln Asn Thr Tyr Lys Gln Thr Val Phe Val Asn Pro Lys Gln
385                 390                 395                 400

Arg Val Leu Gly Asn Thr Trp Val Tyr Ile Lys Gly Tyr Gln Asp Lys
                405                 410                 415

Ile Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Ser Ala Thr Asp Thr Lys Leu Arg
            420                 425                 430

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

Asp Pro Asn Asp Ser Asn Leu Lys Glu Val Thr Asp Gln Phe Lys Asn
    450                 455                 460

Arg Ile Tyr Tyr Glu His Pro Asn Val Ala Ser Ile Lys Phe Gly Asp
465                 470                 475                 480

Ile Thr Lys Thr Tyr Val Val Leu Val Glu Gly His Tyr Asp Asn Thr
                485                 490                 495

Gly Lys Asn Leu Lys Thr Gln Val Ile Gln Glu Asn Val Asp Pro Val
            500                 505                 510

Thr Asn Arg Asp Tyr Ser Ile Phe Gly Trp Asn Asn Glu Asn Val Val
        515                 520                 525
```

Arg Tyr Gly Gly Gly Ser Ala Asp Gly Asp Ser Ala Val Asn
530 535 540

<210> 43
<211> 1626
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 43

ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aagcagaata agtattcgat tagacgtttt 60

acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaactatac tatttgggat aggcaatcat 120

caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacgcaat cttcgaaaaa taatgcaagt 180

gcagattccg aaaaaaacaa tatgatagaa acacctcaat taaatacaac ggctaatgat 240

acatctgata ttagtgcaaa cacaaacagt gcgaatgtag atagcacaac aaaaccaatg 300

tctacacaaa cgagcaatac cactacaaca gagccagctt caacaaatga aacacctcaa 360

ccgacggcaa ttaaaaatca agcaactgct gcaaaaatgc aagatcaaac tgttcctcaa 420

gaagcaaatt ctcaagtaga taataaaaca acgaatgatg ctaatagcat agcaacaacc 480

agtgagctta aaaattctca aacattagat ttaccacaat catcaccaca aacgatttcc 540

aatgcgcaag gaactagtaa accaagtgtt agaacgagag ctgtacgtag tttagctgtt 600

gctgaaccgg tagtaaatgc tgctgatgct aaaggtacaa atgtaaatga taaagttacg 660

gcaagtaatt tcaagttaga aaagactaca tttgacccta atcaaagtgg taacacattt 720

atggcggcaa attttacagt gacagataaa gtgaaatcag gggattattt tacagcgaag 780

ttaccagata gtttaactgg taatggagac gtggattatt ctaattcaaa taatacgatg 840

ccaattgcag acattaaaag tacgaatggc gatgttgtag ctaaagcaac atatgatatc 900

ttgactaaga cgtatacatt tgtctttaca gattatgtaa ataataaaga aaatattaac 960

ggacaatttt cattaccttt atttacagac cgagcaaagg cacctaaatc aggaacatat 1020

gatgcgaata ttaatattgc ggatgaaatg tttaataata aaattactta taactatagt 1080

tcgccaattg caggaattga taaaccaaat ggcgcgaaca tttcttctca aattattggt 1140

gtagatacag cttcaggtca aaacacatac aagcaaacag tatttgttaa ccctaagcaa 1200

cgagttttag gtaatacgtg ggtgtatatt aaaggctacc aagataaaat cgaagaaagt 1260

agcggtaaag taagtgctac agatacaaaa ctgagaattt ttgaagtgaa tgatacatct 1320

aaattatcag atagctacta tgcagatcca aatgactcta accttaaaga agtaacagac 1380

caatttaaaa atagaatcta ttatgagcat ccaaatgtag ctagtattaa atttggtgat 1440

attactaaaa catatgtagt attagtagaa gggcattacg acaatacagg taagaactta 1500

aaaactcagg ttattcaaga aaatgttgat cctgtaacaa atagagacta cagtattttc 1560

ggttggaata atgagaatgt tgtacgttat ggtggtggaa gtgctgatgg tgattcagca 1620

gtaaat 1626

<210> 44
<211> 542
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 44

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

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

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

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

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

Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn Val Asp Ser Thr
                85                  90                  95

Thr Lys Pro Met Ser Thr Gln Thr Ser Asn Thr Thr Thr Thr Glu Pro
            100                 105                 110

Ala Ser Thr Asn Glu Thr Pro Gln Pro Thr Ala Ile Lys Asn Gln Ala
        115                 120                 125

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

Gln Val Asp Asn Lys Thr Thr Asn Asp Ala Asn Ser Ile Ala Thr Thr
145                 150                 155                 160

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

Gln Thr Ile Ser Asn Ala Gln Gly Thr Ser Lys Pro Ser Val Arg Thr
            180                 185                 190

Arg Ala Val Arg Ser Leu Ala Val Ala Glu Pro Val Val Asn Ala Ala
        195                 200                 205
```

```
Asp Ala Lys Gly Thr Asn Val Asn Asp Lys Val Thr Ala Ser Asn Phe
    210                 215                 220

Lys Leu Glu Lys Thr Thr Phe Asp Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Phe
225                 230                 235                 240

Met Ala Ala Asn Phe Thr Val Thr Asp Lys Val Lys Ser Gly Asp Tyr
                245                 250                 255

Phe Thr Ala Lys Leu Pro Asp Ser Leu Thr Gly Asn Gly Asp Val Asp
            260                 265                 270

Tyr Ser Asn Ser Asn Asn Thr Met Pro Ile Ala Asp Ile Lys Ser Thr
        275                 280                 285

Asn Gly Asp Val Val Ala Lys Ala Thr Tyr Asp Ile Leu Thr Lys Thr
    290                 295                 300

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

Gly Gln Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
                325                 330                 335

Ser Gly Thr Tyr Asp Ala Asn Ile Asn Ile Ala Asp Glu Met Phe Asn
            340                 345                 350

Asn Lys Ile Thr Tyr Asn Tyr Ser Ser Pro Ile Ala Gly Ile Asp Lys
        355                 360                 365

Pro Asn Gly Ala Asn Ile Ser Ser Gln Ile Ile Gly Val Asp Thr Ala
    370                 375                 380

Ser Gly Gln Asn Thr Tyr Lys Gln Thr Val Phe Val Asn Pro Lys Gln
385                 390                 395                 400

Arg Val Leu Gly Asn Thr Trp Val Tyr Ile Lys Gly Tyr Gln Asp Lys
                405                 410                 415

Ile Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Ser Ala Thr Asp Thr Lys Leu Arg
            420                 425                 430

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

Asp Pro Asn Asp Ser Asn Leu Lys Glu Val Thr Asp Gln Phe Lys Asn
    450                 455                 460
```

```
Arg Ile Tyr Tyr Glu His Pro Asn Val Ala Ser Ile Lys Phe Gly Asp
465                 470                 475                 480

Ile Thr Lys Thr Tyr Val Val Leu Val Glu Gly His Tyr Asp Asn Thr
                485                 490                 495

Gly Lys Asn Leu Lys Thr Gln Val Ile Gln Glu Asn Val Asp Pro Val
            500                 505                 510

Thr Asn Arg Asp Tyr Ser Ile Phe Gly Trp Asn Asn Glu Asn Val Val
        515                 520                 525

Arg Tyr Gly Gly Gly Ser Ala Asp Gly Asp Ser Ala Val Asn
    530                 535                 540
```

<210> 45
<211> 1626
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 45

```
ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aagcagaata agtattcgat tagacgtttt   60
acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaactatac tatttgggat aggcaatcat  120
caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacgcaat cttcgaaaaa taatgcaagt  180
gcagattccg aaaaaaacaa tatgatagaa acacctcaat taaatacaac ggctaatgat  240
acatctgata ttagtgcaaa cacaaacagt gcgaatgtag atagcacagc aaaaccaatg  300
tctacacaaa cgagcaatac cactacaaca gagccagctt caacaaatga aacacctcaa  360
ccgacggcaa ttaaagatca agcaactgct gcaaaaatgc aagatcaaac tgttcctcaa  420
gaagcaaatt ctcaagtaga taataaaaca acgaatgatg ctaatagcat agcgacaaac  480
tgtgagctta aaaatcctca aacattagat ttaccacaat catcaccaca aacaatttcc  540
aatgcgcaag gaactagtaa accaagtgtt agaacgagag ctgtacgtag tcttgcagtt  600
gctgaacctg tagtaaatgc tgctgatgct aaaggtacaa atgtaaatga taaagttacg  660
gcaaaagatt ttcaattaga aaagaccaca tttgacccta accaaagtgg taatactttt  720
atggcggcaa actttacagt gactggacaa gtgaaatcag gggattattt tacagcgaag  780
ttaccagata gtgtaactgg taatggagac gtggattact ctaattcgaa taatacgatg  840
ccaattgcag atattaaaag tacgaatggc gatgttgtag ctaaagcaac atatgatatc  900
ttgactaaga cgtatacatt tgtctttaca gattatgtaa ataataaaga aaatattaac  960
ggacaatttt cattaccttt atttacagac cgagcaaagg cacctaaatc aggaacatat 1020
gatgcgaata ttaatattgc ggatgaaatg tttaataata aaattactta taactatagt 1080
```

tcgccaattg caggaattga taaaccaaat ggcgcgaaca tttcttctca aattattggt 1140

gtagatacag cttcaggtca aaacacatac aagcaaacag tatttgttaa ccctaagcaa 1200

cgagttttag gtaatacgtg ggtgtatatt aaaggttacc aagataaaat cgaagaaagt 1260

agcggtaaag taagtgctac agatacaaaa ctgagaattt ttgaagtgaa tgatacatct 1320

aaattatcag atagctacta tgcggaccca aatgactcta accttaaaga agtaacgaat 1380

gagtttaagg ataaaatcac ttataaatac caaaatgtag caagtattaa ttttggcgat 1440

attactaaaa cgtatgttgt attagtggaa ggtcactatg ataatactgg taaaaacttg 1500

aaaacacagg ttattcaaga aaatattgac ccagcgacag gtaaagacta cagtattttc 1560

ggttggaata atgagaatgt tgtacgttat ggtggtggaa gtgctgatgg tgattcagca 1620

gtaaat 1626

<210> 46
<211> 542
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 46

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

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

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

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

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

Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn Val Asp Ser Thr
85 90 95

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

Ala Ser Thr Asn Glu Thr Pro Gln Pro Thr Ala Ile Lys Asp Gln Ala
115 120 125

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

```
Gln Val Asp Asn Lys Thr Thr Asn Asp Ala Asn Ser Ile Ala Thr Asn
145                 150                 155                 160

Cys Glu Leu Lys Asn Pro Gln Thr Leu Asp Leu Pro Gln Ser Ser Pro
                165                 170                 175

Gln Thr Ile Ser Asn Ala Gln Gly Thr Ser Lys Pro Ser Val Arg Thr
            180                 185                 190

Arg Ala Val Arg Ser Leu Ala Val Ala Glu Pro Val Val Asn Ala Ala
        195                 200                 205

Asp Ala Lys Gly Thr Asn Val Asn Asp Lys Val Thr Ala Lys Asp Phe
    210                 215                 220

Gln Leu Glu Lys Thr Thr Phe Asp Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Phe
225                 230                 235                 240

Met Ala Ala Asn Phe Thr Val Thr Gly Gln Val Lys Ser Gly Asp Tyr
                245                 250                 255

Phe Thr Ala Lys Leu Pro Asp Ser Val Thr Gly Asn Gly Asp Val Asp
            260                 265                 270

Tyr Ser Asn Ser Asn Asn Thr Met Pro Ile Ala Asp Ile Lys Ser Thr
        275                 280                 285

Asn Gly Asp Val Val Ala Lys Ala Thr Tyr Asp Ile Leu Thr Lys Thr
    290                 295                 300

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

Gly Gln Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
                325                 330                 335

Ser Gly Thr Tyr Asp Ala Asn Ile Asn Ile Ala Asp Glu Met Phe Asn
            340                 345                 350

Asn Lys Ile Thr Tyr Asn Tyr Ser Ser Pro Ile Ala Gly Ile Asp Lys
        355                 360                 365

Pro Asn Gly Ala Asn Ile Ser Ser Gln Ile Ile Gly Val Asp Thr Ala
    370                 375                 380

Ser Gly Gln Asn Thr Tyr Lys Gln Thr Val Phe Val Asn Pro Lys Gln
```

385 390 395 400

Arg Val Leu Gly Asn Thr Trp Val Tyr Ile Lys Gly Tyr Gln Asp Lys
405 410 415

Ile Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Ser Ala Thr Asp Thr Lys Leu Arg
420 425 430

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

Asp Pro Asn Asp Ser Asn Leu Lys Glu Val Thr Asn Glu Phe Lys Asp
450 455 460

Lys Ile Thr Tyr Lys Tyr Gln Asn Val Ala Ser Ile Asn Phe Gly Asp
465 470 475 480

Ile Thr Lys Thr Tyr Val Val Leu Val Glu Gly His Tyr Asp Asn Thr
485 490 495

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

Thr Gly Lys Asp Tyr Ser Ile Phe Gly Trp Asn Asn Glu Asn Val Val
515 520 525

Arg Tyr Gly Gly Gly Ser Ala Asp Gly Asp Ser Ala Val Asn
530 535 540

<210> 47
<211> 1626
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 47

ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aagcagaata agtattcgat tagacgtttt 60

acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaactatac tatttgggat aggcaatcat 120

caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacgcaat cttcgaaaaa taatgcaagt 180

gcagattccg aaaaaaacaa tacgatagaa acacctcaat taaatacaac ggctaatgat 240

acatctgata ttagtgcaaa cacaaacagt gcgaatgtag atagcacagc aaaaccaatg 300

tctacacaaa cgagcaatac cactacaaca gagccagctt caacaaatga aacacctcaa 360

ccgacggcaa ttaaagatca agcaactgct gcaaaaatgc aagatcaaac tgttcctcaa 420

gaagcaaatt ctcaagtaga taataaaaca acgaatgatg ctaatagcat agcgacaaac 480

agcgagctta aaaatcctca gacattagat ttaccacaat catcaccaca aacgatttcc 540

aatgcgcaag gaactagtga accaagtgtt agaacgagag ctgtacgtag tcttgcagtt 600

gctgaacctg tagtaaatgc tgctgatgct aaaggtacaa atgtaaatga taaagttacg 660

gcaagtgatt tcaagttaga aaagactaca tttgacccta accaaagtgg taacacattt 720

atggcggcaa attttaaagt ggcagggaaa gtgaaatcag gggattattt tacagcgaag 780

ttaccagata gtgtaactgg taatggagac gtggattact ctaattcaaa taatacgatg 840

ccaattgcag atatagtgaa tgataaaaaa gaagttgtag ctaaagcaac atatgatatc 900

ttgactaaga cgtatacatt tgtctttaca gattatgtaa atgataaaga aaatattaac 960

ggacaatttt cattaccttt atttacagac cgagcaaagg cacctaaatc aggaacatat 1020

gatgcaaata ttaatattgc ggatgaaatg tttaacaatc aaattactta taactatagt 1080

tcaccaattg caggaattga taagccaaat ggcgcgaaca tttcttctca aattattggt 1140

gtagatacag cttcaggtca aaacacatac aagcaaacgg tatttgttaa ccctaagcaa 1200

cgagttttag gtaatacgtg ggtgtatatt aaaggttacc aagataaaat cgaagaaagt 1260

agcggtaaag taagtgctac agatacaaaa ctgagaattt ttgaagtgaa tgatacatct 1320

aaattatcag atagctacta tgcagaccca aatgactcta accttaaaga agtaactaat 1380

gagtttaagg ataaaatcac ttataaatac caaaacgtag caagtattaa ttttggtgat 1440

ataaataaaa cgtatgtcgt tttagtcgaa ggtcattatg ataatactgg taaaaacttg 1500

aaaacacagg ttattcaaga aaatattgac ccagcgacag gtaaagatta cagtattttc 1560

ggttggaata atgagaatgt tgtacgttat ggaggcggaa gtgctgatgg tgattcagca 1620

gtaaat 1626

<210> 48
<211> 542
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 48

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

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

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

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

Lys Asn Asn Thr Ile Glu Thr Pro Gln Leu Asn Thr Thr Ala Asn Asp
```

65 70 75 80

Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn Val Asp Ser Thr
85 90 95

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

Ala Ser Thr Asn Glu Thr Pro Gln Pro Thr Ala Ile Lys Asp Gln Ala
115 120 125

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

Gln Val Asp Asn Lys Thr Thr Asn Asp Ala Asn Ser Ile Ala Thr Asn
145 150 155 160

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

Gln Thr Ile Ser Asn Ala Gln Gly Thr Ser Glu Pro Ser Val Arg Thr
180 185 190

Arg Ala Val Arg Ser Leu Ala Val Ala Glu Pro Val Val Asn Ala Ala
195 200 205

Asp Ala Lys Gly Thr Asn Val Asn Asp Lys Val Thr Ala Ser Asp Phe
210 215 220

Lys Leu Glu Lys Thr Thr Phe Asp Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Phe
225 230 235 240

Met Ala Ala Asn Phe Lys Val Ala Gly Lys Val Lys Ser Gly Asp Tyr
245 250 255

Phe Thr Ala Lys Leu Pro Asp Ser Val Thr Gly Asn Gly Asp Val Asp
260 265 270

Tyr Ser Asn Ser Asn Asn Thr Met Pro Ile Ala Asp Ile Val Asn Asp
275 280 285

Lys Lys Glu Val Val Ala Lys Ala Thr Tyr Asp Ile Leu Thr Lys Thr
290 295 300

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

```
Gly Gln Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
                325                 330                 335

Ser Gly Thr Tyr Asp Ala Asn Ile Asn Ile Ala Asp Glu Met Phe Asn
            340                 345                 350

Asn Gln Ile Thr Tyr Asn Tyr Ser Ser Pro Ile Ala Gly Ile Asp Lys
        355                 360                 365

Pro Asn Gly Ala Asn Ile Ser Ser Gln Ile Ile Gly Val Asp Thr Ala
    370                 375                 380

Ser Gly Gln Asn Thr Tyr Lys Gln Thr Val Phe Val Asn Pro Lys Gln
385                 390                 395                 400

Arg Val Leu Gly Asn Thr Trp Val Tyr Ile Lys Gly Tyr Gln Asp Lys
                405                 410                 415

Ile Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Ser Ala Thr Asp Thr Lys Leu Arg
            420                 425                 430

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

Asp Pro Asn Asp Ser Asn Leu Lys Glu Val Thr Asn Glu Phe Lys Asp
    450                 455                 460

Lys Ile Thr Tyr Lys Tyr Gln Asn Val Ala Ser Ile Asn Phe Gly Asp
465                 470                 475                 480

Ile Asn Lys Thr Tyr Val Val Leu Val Glu Gly His Tyr Asp Asn Thr
                485                 490                 495

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

Thr Gly Lys Asp Tyr Ser Ile Phe Gly Trp Asn Asn Glu Asn Val Val
        515                 520                 525

Arg Tyr Gly Gly Gly Ser Ala Asp Gly Asp Ser Ala Val Asn
    530                 535                 540
```

<210> 49
<211> 1626
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 49

ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aagcagaata agtattcgat tagacgtttt 60

acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaactatac tatttgggat aggcaatcat 120

caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacgcaat cttcgaaaaa taatgcaagt 180

gcagattccg aaaaaaacaa tatgatagaa acacctcaat taaatacaac ggctaatgat 240

acatctgata ttagtgcaaa cacaaacagt gcgaatgtag atagcacagc aaaaccaatg 300

tctacacaaa cgagcaatac cactacaaca gagccagctt caacaaatga aacacctcaa 360

ccgacggcaa ttaaagatca agcaactgct gcaaaaatgc aagatcaaac tgttcctcaa 420

gaagcaaatt ctcaagtaga taataaaaca acgaatgatg ctaatagcat agcgacaaac 480

agtgagctta aaaatcctca aacattagat ttaccacaat catcaccaca aacgatttcc 540

aatgcgcaaa gaactagtaa accaagtgtt agaaccagag ctgtacgtag tttagctgtt 600

gctgaaccgg tagtaaatgc tgctgatgct aaaggtacaa atgtaaatga taaagttacg 660

gcaagtaatc tacagttgca aaagactacg tttgacccta accaaagtgg taacacattt 720

atggcggcaa attttacagt gacagataaa gtgaaatcag gagattattt tacagcgaag 780

ttaccagata gtttaactgg taatggagac gtggattact ctaattcaaa taatacgatg 840

ccaattgcag atattaaaag tacgaatggc gatgttgtag ctaaagcaac atatgatatc 900

ttgactaaga cgtatacatt tgtctttaca gattatgtaa atgataaaga aaatattaac 960

ggacaatttt cattaccttt atttacagac cgagcaaagg cacctaaatc aggaacatac 1020

gatgcaaata ttaatattgc ggatgaaatg tttaataata aaattactta taactatagt 1080

tcgccaattg caggaattga taagccaaat ggcgcgaaca tttcttctca gattattggt 1140

gtagatacag cttcaggtca aaacacatac aagcaaacgg tatttgttaa ccctaagcaa 1200

cgagttttag gtaatacgtg ggtgtatatt aaaggctacc aagataaaat cgaagaaagt 1260

agcggtaaag taagtgctaa agatacaaaa ctgagaattt ttgaagtgaa tgatacatct 1320

aaattatcag atagctacta tgcagaccca aatgattcga atcttaaaga agtaacagac 1380

caatttaaaa atagaatcta ttatgagcat ccaaatgtag ctagtattaa ttttggcgat 1440

attactaaaa cgtatgttgt attagtggaa ggtcactatg ataatactgg taaaaacttg 1500

aaaacacagg ttattcaaga aaatattgac ccagcgacag gtaaagacta cagtattttc 1560

ggttggaata atgagaatgt tgtacgttat ggtggtggaa gtgctgatgg tgattcagca 1620

gtaaat 1626

<210> 50
<211> 542
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 50

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

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

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

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

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

Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn Val Asp Ser Thr
                85                  90                  95

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

Ala Ser Thr Asn Glu Thr Pro Gln Pro Thr Ala Ile Lys Asp Gln Ala
        115                 120                 125

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

Gln Val Asp Asn Lys Thr Thr Asn Asp Ala Asn Ser Ile Ala Thr Asn
145                 150                 155                 160

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

Gln Thr Ile Ser Asn Ala Gln Arg Thr Ser Lys Pro Ser Val Arg Thr
            180                 185                 190

Arg Ala Val Arg Ser Leu Ala Val Ala Glu Pro Val Val Asn Ala Ala
        195                 200                 205

Asp Ala Lys Gly Thr Asn Val Asn Asp Lys Val Thr Ala Ser Asn Leu
    210                 215                 220

Gln Leu Gln Lys Thr Thr Phe Asp Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Phe
225                 230                 235                 240

Met Ala Ala Asn Phe Thr Val Thr Asp Lys Val Lys Ser Gly Asp Tyr
                245                 250                 255
```

```
Phe Thr Ala Lys Leu Pro Asp Ser Leu Thr Gly Asn Gly Asp Val Asp
            260                 265                 270

Tyr Ser Asn Ser Asn Asn Thr Met Pro Ile Ala Asp Ile Lys Ser Thr
        275                 280                 285

Asn Gly Asp Val Val Ala Lys Ala Thr Tyr Asp Ile Leu Thr Lys Thr
    290                 295                 300

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

Gly Gln Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
                325                 330                 335

Ser Gly Thr Tyr Asp Ala Asn Ile Asn Ile Ala Asp Glu Met Phe Asn
            340                 345                 350

Asn Lys Ile Thr Tyr Asn Tyr Ser Ser Pro Ile Ala Gly Ile Asp Lys
        355                 360                 365

Pro Asn Gly Ala Asn Ile Ser Ser Gln Ile Ile Gly Val Asp Thr Ala
    370                 375                 380

Ser Gly Gln Asn Thr Tyr Lys Gln Thr Val Phe Val Asn Pro Lys Gln
385                 390                 395                 400

Arg Val Leu Gly Asn Thr Trp Val Tyr Ile Lys Gly Tyr Gln Asp Lys
                405                 410                 415

Ile Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Ser Ala Lys Asp Thr Lys Leu Arg
            420                 425                 430

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

Asp Pro Asn Asp Ser Asn Leu Lys Glu Val Thr Asp Gln Phe Lys Asn
    450                 455                 460

Arg Ile Tyr Tyr Glu His Pro Asn Val Ala Ser Ile Asn Phe Gly Asp
465                 470                 475                 480

Ile Thr Lys Thr Tyr Val Val Leu Val Glu Gly His Tyr Asp Asn Thr
                485                 490                 495

Gly Lys Asn Leu Lys Thr Gln Val Ile Gln Glu Asn Ile Asp Pro Ala
            500                 505                 510
```

Thr Gly Lys Asp Tyr Ser Ile Phe Gly Trp Asn Asn Glu Asn Val Val
515 520 525

Arg Tyr Gly Gly Gly Ser Ala Asp Gly Asp Ser Ala Val Asn
530 535 540

<210> 51
<211> 1626
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 51

ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aagcagaata agtattcgat tagacgtttt 60

acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaactatac tatttgggat aggcaatcat 120

caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacgcaat cttcgaaaaa taatgcaagt 180

gcagattccg aaaaaaacaa tatgatagaa acacctcaat taaatacaac ggctaatgat 240

acatctgata ttagtgcaaa cacaaacagt gcgaatgtag atagcacagc aaaaccaatg 300

tctacacaaa cgagcaatac cactacaaca gagccagctt caacaaatga aacacctcaa 360

ccgacggcaa ttaaagatca agcaactgct gcaaaaatgc aagatcaaac tgttcctcaa 420

gaagcaaatt ctcaagtaga taataaaaca acgaatgatg ctaataacat agcaacaaac 480

agtgggctta aaaatcctca aacattagat ttaccacaat catcaccaca aacgatttcc 540

aatgcgcaag gaactagtaa accaagtgtt agaacgagag ctgtacgtag tcttgcagtt 600

gctgaacctg tagtaaatgc tgctgatgct aaaggtacaa atgtaaatga taaagttacg 660

gcaagtgatt tcaagttaga aaagactaca ttcgacccta accaaagtgg taacacattt 720

atggcggcaa attttacagt gacagataaa gtgaaatcag gggattattt tacagcgaag 780

ttaccagata gtttaactgg taatggagac gtggattact ctaattcaaa taatacgatg 840

ccaattgcag acattaaaag tacgaatggt gatgttgtag cgacagcgac ttataatatc 900

ttgactaaga cgtatacatt tgtctttaca gattatgtaa atgataaaga aaatattaac 960

ggacaatttt cattaccttt atttacagac cgagcaaagg cacctaaatc aggaacatat 1020

gatgcaaata ttaatattgc ggatgaaatg tttaataata aaattactta taactatagt 1080

tcgccaattg caggaattga taagccaaat ggcgcgaaca tttcttctca aattattggt 1140

gtagatacag cttcaggcca aaacacatac aagcaaacgg tatttgttaa ccctaagcaa 1200

cgagttttag gtaatacgtg ggtgtatatt aaaggctacc aagataaaat cgaagaaagt 1260

agcggtaaag taagtgctac agatacaaaa ctgagaattt ttgaagtgaa tgatacatct 1320

aaattatcag atagctacta tgcggaccca aatgactcta atcttaaaga agtaacgaat 1380

gagtttaagg ataaaatcac ttataaatac caaaatgtag caagtattaa ttttggcgat 1440

attactaaaa cgtatgttgt attagtggaa ggtcactatg ataatactgg taaaaacttg 1500

aaaacacagg ttattcaaga aaatattgac ccagcgacag gtaaagatta cagtattttc 1560

ggttggaata atgagaatgt tgtacgttat ggaggcggaa gtgctgatgg tgattcagca 1620

gtaaat 1626

<210> 52
<211> 542
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 52

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

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

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

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

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

Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn Val Asp Ser Thr
                85                  90                  95

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

Ala Ser Thr Asn Glu Thr Pro Gln Pro Thr Ala Ile Lys Asp Gln Ala
        115                 120                 125

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

Gln Val Asp Asn Lys Thr Thr Asn Asp Ala Asn Asn Ile Ala Thr Asn
145                 150                 155                 160

Ser Gly Leu Lys Asn Pro Gln Thr Leu Asp Leu Pro Gln Ser Ser Pro
                165                 170                 175

Gln Thr Ile Ser Asn Ala Gln Gly Thr Ser Lys Pro Ser Val Arg Thr
            180                 185                 190
```

```
Arg Ala Val Arg Ser Leu Ala Val Ala Glu Pro Val Val Asn Ala Ala
        195                 200                 205

Asp Ala Lys Gly Thr Asn Val Asn Asp Lys Val Thr Ala Ser Asp Phe
    210                 215                 220

Lys Leu Glu Lys Thr Thr Phe Asp Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Phe
225                 230                 235                 240

Met Ala Ala Asn Phe Thr Val Thr Asp Lys Val Lys Ser Gly Asp Tyr
                245                 250                 255

Phe Thr Ala Lys Leu Pro Asp Ser Leu Thr Gly Asn Gly Asp Val Asp
            260                 265                 270

Tyr Ser Asn Ser Asn Asn Thr Met Pro Ile Ala Asp Ile Lys Ser Thr
        275                 280                 285

Asn Gly Asp Val Val Ala Thr Ala Thr Tyr Asn Ile Leu Thr Lys Thr
    290                 295                 300

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

Gly Gln Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
                325                 330                 335

Ser Gly Thr Tyr Asp Ala Asn Ile Asn Ile Ala Asp Glu Met Phe Asn
            340                 345                 350

Asn Lys Ile Thr Tyr Asn Tyr Ser Ser Pro Ile Ala Gly Ile Asp Lys
        355                 360                 365

Pro Asn Gly Ala Asn Ile Ser Ser Gln Ile Ile Gly Val Asp Thr Ala
    370                 375                 380

Ser Gly Gln Asn Thr Tyr Lys Gln Thr Val Phe Val Asn Pro Lys Gln
385                 390                 395                 400

Arg Val Leu Gly Asn Thr Trp Val Tyr Ile Lys Gly Tyr Gln Asp Lys
                405                 410                 415

Ile Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Ser Ala Thr Asp Thr Lys Leu Arg
            420                 425                 430

Ile Phe Glu Val Asn Asp Thr Ser Lys Leu Ser Asp Ser Tyr Tyr Ala
```

435 440 445

Asp Pro Asn Asp Ser Asn Leu Lys Glu Val Thr Asn Glu Phe Lys Asp
450 455 460

Lys Ile Thr Tyr Lys Tyr Gln Asn Val Ala Ser Ile Asn Phe Gly Asp
465 470 475 480

Ile Thr Lys Thr Tyr Val Val Leu Val Glu Gly His Tyr Asp Asn Thr
485 490 495

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

Thr Gly Lys Asp Tyr Ser Ile Phe Gly Trp Asn Asn Glu Asn Val Val
515 520 525

Arg Tyr Gly Gly Gly Ser Ala Asp Gly Asp Ser Ala Val Asn
530 535 540

<210> 53
<211> 1626
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 53

ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aagcagaata agtattcgat tagacgtttt 60

acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaactatac tatttgggat aggcaatcat 120

caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacgcaat cttcgaaaaa taatgcaagt 180

gcagattccg aaaaaaacaa tatgatagaa acacctcaat taaatacaac ggctaatgat 240

acatctgata ttagtgcaaa cacaaacagt gcgaatgtag atagcacagc aaaaccaatg 300

tctacacaaa cgagcaatac cactacaaca gagccagctt caacaaatga aacacctcaa 360

ccgacggcaa ttaaagatca agcaactgct gcaaaaatgc aagatcaaac tgttcctcaa 420

gaagcaaatt ctcaagtaga taataaaaca acgaatgatg ctaataacat agcaacaaac 480

agtgagctta aaaatcctca aacattagat ttaccacaat catcaccaca aacgatttcc 540

aatgcgcaag gaactagtaa accaagtgtt agaacgagag ctgtacgtag tcttgcagtt 600

gctgaacctg tagtaaatgc tgctgatgct aaaggtacaa atgtaaatga taaagttacg 660

gcaagtgatt tcaagttaga aaagactaca ttcgacccta accaaagtgg taacacattt 720

atggcggcaa attttacagt gacagataaa gtgaaatcag gggattattt tacagcgaag 780

ttaccagata gtttaactgg taatggagac gtggattact ctaattcaaa taatacgatg 840

ccaattgcag acattaaaag tacgaatggt gatgttgtag cgacagcgac ttataatatc 900

ttgactaaga cgtatacatt tgtctttaca gattatgtaa atgataaaga aaatattaac 960

ggacaatttt cattaccttt atttacagac cgagcaaagg cacctaaatc aggaacatat 1020

gatgcaaata ttaatattgc ggatgaaatg tttaataata aaattactta taactatagt 1080

tcgccaattg caggaattga taagccaaat ggcgcgaaca tttcttctca aattattggt 1140

gtagatacag cttcaggcca aaacacatac aagcaaacgg tatttgttaa ccctaagcaa 1200

cgagttttag gtaatacgtg ggtgtatatt aaaggctacc aagataaaat cgaagaaagt 1260

agcggtaaag taagtgctac agatacaaaa ctgagaattt ttgaagtgaa tgatacatct 1320

aaattatcag atagctacta tgcggaccca aatgactcta atcttaaaga agtaacgaat 1380

gagtttaagg ataaaatcac ttataaatac caaaatgtag caagtattaa ttttggcgat 1440

attactaaaa cgtatgttgt attagtggaa ggtcactatg ataatactgg taaaaacttg 1500

aaaacacagg ttattcaaga aaatattgac ccagcgacag gtaaagatta cagtattttc 1560

ggttggaata atgagaatgt tgtacgttat ggaggcggaa gtgctgatgg tgattcagca 1620

gtaaat 1626

<210> 54
<211> 542
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 54

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

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

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

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

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

Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn Val Asp Ser Thr
                85                  90                  95

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

Ala Ser Thr Asn Glu Thr Pro Gln Pro Thr Ala Ile Lys Asp Gln Ala
```

```
        115                 120                 125

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

Gln Val Asp Asn Lys Thr Thr Asn Asp Ala Asn Asn Ile Ala Thr Asn
145                 150                 155                 160

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

Gln Thr Ile Ser Asn Ala Gln Gly Thr Ser Lys Pro Ser Val Arg Thr
            180                 185                 190

Arg Ala Val Arg Ser Leu Ala Val Ala Glu Pro Val Val Asn Ala Ala
        195                 200                 205

Asp Ala Lys Gly Thr Asn Val Asn Asp Lys Val Thr Ala Ser Asp Phe
    210                 215                 220

Lys Leu Glu Lys Thr Thr Phe Asp Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Phe
225                 230                 235                 240

Met Ala Ala Asn Phe Thr Val Thr Asp Lys Val Lys Ser Gly Asp Tyr
                245                 250                 255

Phe Thr Ala Lys Leu Pro Asp Ser Leu Thr Gly Asn Gly Asp Val Asp
            260                 265                 270

Tyr Ser Asn Ser Asn Asn Thr Met Pro Ile Ala Asp Ile Lys Ser Thr
        275                 280                 285

Asn Gly Asp Val Val Ala Thr Ala Thr Tyr Asn Ile Leu Thr Lys Thr
    290                 295                 300

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

Gly Gln Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
                325                 330                 335

Ser Gly Thr Tyr Asp Ala Asn Ile Asn Ile Ala Asp Glu Met Phe Asn
            340                 345                 350

Asn Lys Ile Thr Tyr Asn Tyr Ser Ser Pro Ile Ala Gly Ile Asp Lys
        355                 360                 365
```

```
Pro Asn Gly Ala Asn Ile Ser Ser Gln Ile Ile Gly Val Asp Thr Ala
    370                 375                 380

Ser Gly Gln Asn Thr Tyr Lys Gln Thr Val Phe Val Asn Pro Lys Gln
385                 390                 395                 400

Arg Val Leu Gly Asn Thr Trp Val Tyr Ile Lys Gly Tyr Gln Asp Lys
                405                 410                 415

Ile Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Ser Ala Thr Asp Thr Lys Leu Arg
            420                 425                 430

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

Asp Pro Asn Asp Ser Asn Leu Lys Glu Val Thr Asn Glu Phe Lys Asp
    450                 455                 460

Lys Ile Thr Tyr Lys Tyr Gln Asn Val Ala Ser Ile Asn Phe Gly Asp
465                 470                 475                 480

Ile Thr Lys Thr Tyr Val Val Leu Val Glu Gly His Tyr Asp Asn Thr
                485                 490                 495

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

Thr Gly Lys Asp Tyr Ser Ile Phe Gly Trp Asn Asn Glu Asn Val Val
        515                 520                 525

Arg Tyr Gly Gly Gly Ser Ala Asp Gly Asp Ser Ala Val Asn
    530                 535                 540
```

<210> 55
<211> 1626
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 55

ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aagcagaata agtattcgat tagacgtttt 60

acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaactatac tatttgggat aggcaatcat 120

caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacgcaat cttcgaaaaa taatgcaagt 180

gcagattccg aaaaaaacaa tatgatagaa acacctcaat taaatacaac ggctaatgat 240

acatctgata ttagtgcaaa cacaaacagt gcgaatgtag atagcacagc aaaaccaatg 300

tctacacaaa cgagcaatac cactacaaca gagccagctt caacaaatga aacacctcaa 360

ccgacggcaa ttaaagatca agcaactgct gcaaaaatgc aagatcaaac tgttcctcaa 420

gaagcaaatt ctcaagtaga taataaaaca acgaatgatg ctaatagcat agcgacaaac 480

agtgagctta aaaatcctca aacattagat ttaccacaat catcaccaca aacaatttcc 540

aatgcgcaag gaactagtaa accaagtgtt agaacgagag ctgtacgtag tcttgcagtt 600

gctgaacctg tagtaaatgc tgctgatgct aaaggtacaa atgtaaatga taaagttacg 660

gcaaaagatt ttcaattaga aaagaccaca tttgacccta accaaagtgg taatactttt 720

atggcggcaa actttacagt gactggacaa gtgaaatcag gggattattt tacagcgaag 780

ttaccagata gtgtaactgg taatggagac gtggattact ctaattcgaa taatacgatg 840

ccaattgcag atattaaaag tacgaatggc gatgttgtag ctaaagcaac atatgatatc 900

ttgactaaga cgtatacatt tgtctttaca gattatgtaa ataataaaga aaatattaac 960

ggacaatttt cattaccttt atttacagac cgagcaaagg cacctaaatc aggaacatat 1020

gatgcgaata ttaatattgc ggatgaaatg tttaataata aaattactta taactatagt 1080

tcgccaattg caggaattga taaaccaaat ggcgcgaaca tttcttctca aattattggt 1140

gtagatacag cttcaggtca aaacacatac aagcaaacag tatttgttaa ccctaagcaa 1200

cgagttttag gtaatacgtg ggtgtatatt aaaggttacc aagataaaat cgaagaaagt 1260

agcggtaaag taagtgctac agatacaaaa ctgagaattt ttgaagtgaa tgatacatct 1320

aaattatcag atagctacta tgcggaccca aatgactcta accttaaaga agtaacgaat 1380

gagtttaagg ataaaatcac ttataaatac caaaatgtag caagtattaa ttttggcgat 1440

attactaaaa cgtatgttgt attagtggaa ggtcactatg ataatactgg taaaaacttg 1500

aaaacacagg ttattcaaga aaatattgac ccagcgacag gtaaagacta cagtattttc 1560

ggttggaata atgagaatgt tgtacgttat ggtggtggaa gtgctgatgg tgattcagca 1620

gtaaat 1626

<210> 56
<211> 542
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 56

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

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

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

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

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

Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn Val Asp Ser Thr
                85                  90                  95

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

Ala Ser Thr Asn Glu Thr Pro Gln Pro Thr Ala Ile Lys Asp Gln Ala
        115                 120                 125

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

Gln Val Asp Asn Lys Thr Thr Asn Asp Ala Asn Ser Ile Ala Thr Asn
145                 150                 155                 160

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

Gln Thr Ile Ser Asn Ala Gln Gly Thr Ser Lys Pro Ser Val Arg Thr
            180                 185                 190

Arg Ala Val Arg Ser Leu Ala Val Ala Glu Pro Val Val Asn Ala Ala
        195                 200                 205

Asp Ala Lys Gly Thr Asn Val Asn Asp Lys Val Thr Ala Lys Asp Phe
    210                 215                 220

Gln Leu Glu Lys Thr Thr Phe Asp Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Phe
225                 230                 235                 240

Met Ala Ala Asn Phe Thr Val Thr Gly Gln Val Lys Ser Gly Asp Tyr
                245                 250                 255

Phe Thr Ala Lys Leu Pro Asp Ser Val Thr Gly Asn Gly Asp Val Asp
            260                 265                 270

Tyr Ser Asn Ser Asn Asn Thr Met Pro Ile Ala Asp Ile Lys Ser Thr
        275                 280                 285

Asn Gly Asp Val Val Ala Lys Ala Thr Tyr Asp Ile Leu Thr Lys Thr
    290                 295                 300
```

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

Gly Gln Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
                325                 330                 335

Ser Gly Thr Tyr Asp Ala Asn Ile Asn Ile Ala Asp Glu Met Phe Asn
            340                 345                 350

Asn Lys Ile Thr Tyr Asn Tyr Ser Ser Pro Ile Ala Gly Ile Asp Lys
        355                 360                 365

Pro Asn Gly Ala Asn Ile Ser Ser Gln Ile Ile Gly Val Asp Thr Ala
    370                 375                 380

Ser Gly Gln Asn Thr Tyr Lys Gln Thr Val Phe Val Asn Pro Lys Gln
385                 390                 395                 400

Arg Val Leu Gly Asn Thr Trp Val Tyr Ile Lys Gly Tyr Gln Asp Lys
                405                 410                 415

Ile Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Ser Ala Thr Asp Thr Lys Leu Arg
            420                 425                 430

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

Asp Pro Asn Asp Ser Asn Leu Lys Glu Val Thr Asn Glu Phe Lys Asp
    450                 455                 460

Lys Ile Thr Tyr Lys Tyr Gln Asn Val Ala Ser Ile Asn Phe Gly Asp
465                 470                 475                 480

Ile Thr Lys Thr Tyr Val Val Leu Val Glu Gly His Tyr Asp Asn Thr
                485                 490                 495

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

Thr Gly Lys Asp Tyr Ser Ile Phe Gly Trp Asn Asn Glu Asn Val Val
        515                 520                 525

Arg Tyr Gly Gly Gly Ser Ala Asp Gly Asp Ser Ala Val Asn
    530                 535                 540
```

<210> 57
<211> 1626
<212> ADN

<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 57

ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aagcagaata agtattcgat tagacgtttt 60

acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaactatac tatttgggat aggcaatcat 120

caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacgcaat cttcgaaaaa taatgcaagt 180

gcagattccg aaaaaaacaa tacgatagaa acacctcaat taaatacaac ggctaatgat 240

acatctgata ttagtgcaaa cacaaacagt gcgaatgtag atagcacagc aaaaacaatg 300

tctacacaaa cgagcaatac cactacaaca gagccagctt caacaaatga aacacctcaa 360

ccgacggcaa ttaaagatca agcaactgct gcaaaaatgc aagatcaaac tgttcctcaa 420

gaagcaaatt ctcaagtaga taataaaaca acgaatgatg ctaataacat agcaacaaac 480

agtgagctta aaaatcctca aacattagat ttaccacaat catcaccaca aacgatttcc 540

aatgcgcaag gaactagtaa accaagtgtt agaacgagag ctgtacgtag tcttgcagtt 600

gctgaacctg tagtaaatgc tgctgatgct aaaggtacaa atgtaaatga taaagttacg 660

gcaagtgatc tcaagttaga aaagactgca tttgacccta accaaagtgg taacacattt 720

atggcggcaa attttaaagt gactggacaa gtgaaatcag gggattattt tacagcgaag 780

ttaccagata gtgtaactgg taatggagac gtggattact ctaattcaaa taatacgatg 840

ccaattgcag acattaaaag tacgaatggc gatgttgtag ctaaagcaac atatgatatc 900

ttgactaaga cgtatacatt tgtctttaca gattatgtaa atgataaaga aaatattaac 960

ggacaatttt cattaccttt atttacagac cgagcaaagg cacctaaatc aggaacatat 1020

gatgcaaata ttaatattgc ggatgaaatg tttgataata aaattactta taactatagt 1080

tcgccaattg caggaattga taagccaaat ggcgcgaaca tttcttctca aattattggt 1140

gtagatacag cttcaggtca aaacacatac aagcaaacgg tatttgttaa ccctaagcaa 1200

cgagttttag gtaatacgtg ggtgtatatt aaaggttacc aagataaaat cgaagaaagt 1260

agcggtaaag taagtgctac agatacaaaa ctgagaattt ttgaagtgaa tgatacatct 1320

aaattatcag atagctacta tgcagaccca aatgactcta accttaaaga agtgactggt 1380

gagtttaaag ataaaatttc atacaaatac gataacgtag caagtattaa ttttggtgat 1440

ataaataaaa cgtatgttgt attagtggaa ggtcactatg ataatactgg taaaaacttg 1500

aaaacacagg ttattcaaga aaatattgac tcagcgacag gtaaagacta cagtattttc 1560

ggttggaata atgagaatgt tgtacgttat ggaggcggaa gtgctgatgg tgattcagca 1620

gtaaat 1626

<210> 58
<211> 542
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 58

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

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

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

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

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

Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn Val Asp Ser Thr
                85                  90                  95

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

Ala Ser Thr Asn Glu Thr Pro Gln Pro Thr Ala Ile Lys Asp Gln Ala
        115                 120                 125

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

Gln Val Asp Asn Lys Thr Thr Asn Asp Ala Asn Asn Ile Ala Thr Asn
145                 150                 155                 160

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

Gln Thr Ile Ser Asn Ala Gln Gly Thr Ser Lys Pro Ser Val Arg Thr
            180                 185                 190

Arg Ala Val Arg Ser Leu Ala Val Ala Glu Pro Val Val Asn Ala Ala
        195                 200                 205

Asp Ala Lys Gly Thr Asn Val Asn Asp Lys Val Thr Ala Ser Asp Leu
    210                 215                 220

Lys Leu Glu Lys Thr Ala Phe Asp Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Phe
225                 230                 235                 240
```

```
Met Ala Ala Asn Phe Lys Val Thr Gly Gln Val Lys Ser Gly Asp Tyr
                245                 250                 255

Phe Thr Ala Lys Leu Pro Asp Ser Val Thr Gly Asn Gly Asp Val Asp
            260                 265                 270

Tyr Ser Asn Ser Asn Asn Thr Met Pro Ile Ala Asp Ile Lys Ser Thr
        275                 280                 285

Asn Gly Asp Val Val Ala Lys Ala Thr Tyr Asp Ile Leu Thr Lys Thr
    290                 295                 300

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

Gly Gln Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
                325                 330                 335

Ser Gly Thr Tyr Asp Ala Asn Ile Asn Ile Ala Asp Glu Met Phe Asp
            340                 345                 350

Asn Lys Ile Thr Tyr Asn Tyr Ser Ser Pro Ile Ala Gly Ile Asp Lys
        355                 360                 365

Pro Asn Gly Ala Asn Ile Ser Ser Gln Ile Ile Gly Val Asp Thr Ala
    370                 375                 380

Ser Gly Gln Asn Thr Tyr Lys Gln Thr Val Phe Val Asn Pro Lys Gln
385                 390                 395                 400

Arg Val Leu Gly Asn Thr Trp Val Tyr Ile Lys Gly Tyr Gln Asp Lys
                405                 410                 415

Ile Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Ser Ala Thr Asp Thr Lys Leu Arg
            420                 425                 430

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

Asp Pro Asn Asp Ser Asn Leu Lys Glu Val Thr Gly Glu Phe Lys Asp
    450                 455                 460

Lys Ile Ser Tyr Lys Tyr Asp Asn Val Ala Ser Ile Asn Phe Gly Asp
465                 470                 475                 480

Ile Asn Lys Thr Tyr Val Val Leu Val Glu Gly His Tyr Asp Asn Thr
```

485 490 495

Gly Lys Asn Leu Lys Thr Gln Val Ile Gln Glu Asn Ile Asp Ser Ala
500 505 510

Thr Gly Lys Asp Tyr Ser Ile Phe Gly Trp Asn Asn Glu Asn Val Val
515 520 525

Arg Tyr Gly Gly Gly Ser Ala Asp Gly Asp Ser Ala Val Asn
530 535 540

<210> 59
<211> 1626
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 59

ttgaaaaaaa gaattgatta tttgtcgaat aagcagaata agtattcgat tagacgtttt 60

acagtaggta ccacatcagt aatagtaggg gcaactatac tatttgggat aggcaatcat 120

caagcacaag cttcagaaca atcgaacgat acaacgcaat cttcgaaaaa taatgcaagt 180

gcagattccg aaaaaaacaa tatgatagaa acacctcaat taaatacaac ggctaatgat 240

acatctgata ttagtgcaaa cacaaacagt gcgaatgtag atagcacaac aaaaccaatg 300

tctacacaaa cgagcaatac cactacaaca gagccagctt caacaaatga aacacctcaa 360

ccgacggcaa ttaaaaatca agcaactgct gcaaaaatgc aagatcaaac tgttcctcaa 420

gaagcaaatt ctcaagtaga taataaaaca acgaatgatg ctaatagcat agcaacaaac 480

agtgagctta aaaattctca aacattagat ttaccacaat catcaccaca aacgatttcc 540

aatgcgcaag gaactagtaa accaagtgtt agaacgagag ctgtacgtag tttagctgtt 600

gctgaaccgg tagtaaatgc tgctgatgct aaagatacaa atgtaaatga taaagttacg 660

gcaagtaatt tcaagttaga aaagactaca tttgacccta atcaaagtgg taacacattt 720

atggcggcaa attttacagt gacagataaa gtgaaatcag gggattattt tacagcgaag 780

ttaccagata gtttaactgg taatggagac gtggattatt ctaattcaaa taatacgatg 840

ccaattgcag acattaaaag tacgaatggc gatgttgtag ctaaagcaac atatgatatc 900

ttgactaaga cgtatacatt tgtctttaca gattatgtaa ataataaaga aaatattaac 960

ggacaatttt cattaccttt atttacagac cgagcaaagg cacctaaatc aggaacatat 1020

gatgcgaata ttaatattgc ggatgaaatg tttaataata aaattactta taactatagt 1080

tcgccaattg caggaattga taaaccaaat ggcgcgaaca tttcttctca aattattggt 1140

gtagatacag cttcaggtca aaacacatac aagcaaacag tatttgttaa ccctaagcaa 1200

cgagttttag gtaatacgtg ggtgtatatt aaaggctacc aagataaaat cgaagaaagt 1260

agcggtaaag taagtgctac agatacaaaa ctgagaattt ttgaagtgaa tgatacatct 1320

aaattatcag atagctacta tgcagatcca aatgactcta accttaaaga agtaacagac 1380

caatttaaaa atagaatcta ttatgagcat ccaaatgtag ctagtattaa atttggtgat 1440

attactaaaa catatgtagt attagtagaa gggcattacg acaatacagg taagaactta 1500

aaaactcagg ttattcaaga aaatgttgat cctgtaacaa atagagacta cagtattttc 1560

ggttggaata atgagaatgt tgtacgttat ggtggtggaa gtgctgatgg tgattcagca 1620

gtaaat 1626

<210> 60
<211> 542
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 60

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

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

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

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

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

Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn Val Asp Ser Thr
                85                  90                  95

Thr Lys Pro Met Ser Thr Gln Thr Ser Asn Thr Thr Thr Thr Glu Pro
            100                 105                 110

Ala Ser Thr Asn Glu Thr Pro Gln Pro Thr Ala Ile Lys Asn Gln Ala
        115                 120                 125

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

Gln Val Asp Asn Lys Thr Thr Asn Asp Ala Asn Ser Ile Ala Thr Asn
145                 150                 155                 160

Ser Glu Leu Lys Asn Ser Gln Thr Leu Asp Leu Pro Gln Ser Ser Pro
```

```
                165                 170                 175

Gln Thr Ile Ser Asn Ala Gln Gly Thr Ser Lys Pro Ser Val Arg Thr
            180                 185                 190

Arg Ala Val Arg Ser Leu Ala Val Ala Glu Pro Val Val Asn Ala Ala
        195                 200                 205

Asp Ala Lys Asp Thr Asn Val Asn Asp Lys Val Thr Ala Ser Asn Phe
    210                 215                 220

Lys Leu Glu Lys Thr Thr Phe Asp Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Phe
225                 230                 235                 240

Met Ala Ala Asn Phe Thr Val Thr Asp Lys Val Lys Ser Gly Asp Tyr
                245                 250                 255

Phe Thr Ala Lys Leu Pro Asp Ser Leu Thr Gly Asn Gly Asp Val Asp
            260                 265                 270

Tyr Ser Asn Ser Asn Asn Thr Met Pro Ile Ala Asp Ile Lys Ser Thr
        275                 280                 285

Asn Gly Asp Val Val Ala Lys Ala Thr Tyr Asp Ile Leu Thr Lys Thr
    290                 295                 300

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

Gly Gln Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
                325                 330                 335

Ser Gly Thr Tyr Asp Ala Asn Ile Asn Ile Ala Asp Glu Met Phe Asn
            340                 345                 350

Asn Lys Ile Thr Tyr Asn Tyr Ser Ser Pro Ile Ala Gly Ile Asp Lys
        355                 360                 365

Pro Asn Gly Ala Asn Ile Ser Ser Gln Ile Ile Gly Val Asp Thr Ala
    370                 375                 380

Ser Gly Gln Asn Thr Tyr Lys Gln Thr Val Phe Val Asn Pro Lys Gln
385                 390                 395                 400

Arg Val Leu Gly Asn Thr Trp Val Tyr Ile Lys Gly Tyr Gln Asp Lys
                405                 410                 415
```

```
Ile Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Ser Ala Thr Asp Thr Lys Leu Arg
            420                 425                 430

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

Asp Pro Asn Asp Ser Asn Leu Lys Glu Val Thr Asp Gln Phe Lys Asn
    450                 455                 460

Arg Ile Tyr Tyr Glu His Pro Asn Val Ala Ser Ile Lys Phe Gly Asp
465                 470                 475                 480

Ile Thr Lys Thr Tyr Val Val Leu Val Glu Gly His Tyr Asp Asn Thr
                485                 490                 495

Gly Lys Asn Leu Lys Thr Gln Val Ile Gln Glu Asn Val Asp Pro Val
            500                 505                 510

Thr Asn Arg Asp Tyr Ser Ile Phe Gly Trp Asn Asn Glu Asn Val Val
        515                 520                 525

Arg Tyr Gly Gly Gly Ser Ala Asp Gly Asp Ser Ala Val Asn
    530                 535                 540
```

<210> 61
<211> 1677
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 61

atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60

gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120

gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180

agcgttagtg ctgcacctaa aacagacgac acaaacgtga gtgatactaa aacatcgtca 240

aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300

tcatcatcaa caaatgcaac tacggaagaa acgccggtaa ctggtgaagc tactactacg 360

acaacgaatc aagctaatac accggcaaca actcaatcaa gcaatacaaa tgcggaggaa 420

ttagtgaatc aaacaagtaa tgaaacgact tctaatgata ctaatacagt atcatctgta 480

aattcacctc aaaattctac aaatgcggaa aatgtttcaa caacgcaaga tacttcaact 540

gaagcaacac cttcaaacaa tgaatcagct ccacagagta cagatgcaag taataaagat 600

gtagttaatc aagcggttaa tacaagtgcg cctagaatga gagcatttag tttagcggca 660

gtagctgcag atgcaccggc agctggcaca gatattacga atcagttgac gaatgtgaca 720

gttggtattg actctggtac gactgtgtat ccgcaccaag caggttatgt caaactgaat 780

tatggttttt cagtgcctaa ttctgctgtt aaaggtgaca cattcaaaat aactgtacct 840

aaagaattaa acttaaatgg tgtaacttca actgctaaag tgccaccaat tatggctgga 900

gatcaagtat tggcaaatgg tgtaatcgat agtgatggta atgttattta tacatttaca 960

gactatgtaa atactaaaga tgatgtaaaa gcaactttga ccatgcccgc ttatattgac 1020

cctgaaaatg ttaaaaagac aggtaatgtg acattggcta ctggcatagg tagtacaaca 1080

gcaaacaaaa cagtattagt agattatgaa aaatatggta agttttataa cttatctatt 1140

aaaggtacaa ttgaccaaat cgataaaaca aataatacgt atcgtcagac aatttatgtc 1200

aatccaagtg gagataacgt tattgcgccg gttttaacag gtaatttaaa accaaatacg 1260

gatagtaatg cattaataga tcagcaaaat acaagtatta aagtatataa agtagataat 1320

gcagctgatt tatctgaaag ttactttgtg aatccagaaa actttgagga tgtcactaat 1380

agtgtgaata ttacattccc aaatccaaat caatataaag tagagtttaa tacgcctgat 1440

gatcaaatta caacaccgta tatagtagtt gttaatggtc atattgatcc gaatagcaaa 1500

ggtgatttag ctttacgttc aactttatat gggtataact cgaatataat ttggcgctct 1560

atgtcatggg acaacgaagt agcatttaat aacggatcag gttctggtga cggtatcgat 1620

aaaccagttg ttcctgaaca acctgatgag cctggtgaaa ttgaaccaat tccagag 1677

<210> 62
<211> 559
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 62

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

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

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

Ser Ala Ser Asn Glu Ser Lys Ser Asn Asp Ser Ser Ser Val Ser Ala
    50                  55                  60

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

Asn Thr Asn Asn Gly Glu Thr Ser Val Ala Gln Asn Pro Ala Gln Gln
                85                  90                  95
```

```
Glu Thr Thr Gln Ser Ser Ser Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro
            100                 105                 110

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

Ala Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln
    130                 135                 140

Thr Ser Asn Glu Thr Thr Ser Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val
145                 150                 155                 160

Asn Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln
                165                 170                 175

Asp Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln
            180                 185                 190

Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr
        195                 200                 205

Ser Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp
    210                 215                 220

Ala Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asn Val Thr
225                 230                 235                 240

Val Gly Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr
                245                 250                 255

Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly
            260                 265                 270

Asp Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val
        275                 280                 285

Thr Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu
    290                 295                 300

Ala Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr
305                 310                 315                 320

Asp Tyr Val Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Met Pro
                325                 330                 335

Ala Tyr Ile Asp Pro Glu Asn Val Lys Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu
            340                 345                 350
```

```
Ala Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp
        355                 360                 365

Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile
    370                 375                 380

Asp Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val
385                 390                 395                 400

Asn Pro Ser Gly Asp Asn Val Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu
                405                 410                 415

Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser
            420                 425                 430

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

Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile
    450                 455                 460

Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro Asp
465                 470                 475                 480

Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp
                485                 490                 495

Pro Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr
            500                 505                 510

Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala
        515                 520                 525

Phe Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val
    530                 535                 540

Pro Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
545                 550                 555
```

<210> 63
<211> 1677
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 63

atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60

gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120

gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180

agcgttagtg ctgcacctaa aacagacgac acaaacgtga gtgatactaa aacatcgtca 240

aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300

tcatcatcaa caaatgcaac tacggaagaa acgccggtaa ctggtgaagc tactactacg 360

acaacgaatc aagctaatac accggcaaca actcaatcaa gcaatacaaa tgcggaggaa 420

ttagtgaatc aaacaagtaa tgaaacgact tctaatgata ctaatacagt atcatctgta 480

aattcacctc aaaattctac aaatgcggaa aatgtttcaa caacgcaaga tacttcaact 540

gaagcaacac cttcaaacaa tgaatcagct ccacagaata cagatgcaag taataaagat 600

gtagttagtc aagcggttaa tccaagtacg cctagaatga gagcatttag tttagcggca 660

gtagctgcag atgcaccggc agctggcaca gatattacga atcagttgac agatgtgaaa 720

gttactattg actctggtac gactgtgtat ccgcaccaag caggttatgt caaactgaat 780

tatggttttt cagtgcctaa ttctgctgtt aaaggtgaca cattcaaaat aactgtacct 840

aaagaattaa acttaaatgg tgtaacttca actgctaaag tgccaccaat tatggctgga 900

gatcaagtat tggcaaatgg tgtaatcgat agtgatggta atgttattta tacatttaca 960

gactatgttg ataataaaga aaatgtaaca gctaatatta ctatgccagc ttatattgac 1020

cctgaaaatg ttacaaagac aggtaatgtg acattgacaa ctggcatagg aaccaatact 1080

gctagtaaga cagtattaat cgactatgag aaatatggac aattccataa tttatcaatt 1140

aaaggtacga ttgatcaaat cgataaaaca aataatacgt atcgccaaac aatttatgtc 1200

aatccaagcg gagataacgt tgtgttacct gccttaacag gtaatttaat tcctaataca 1260

aagagtaatg cgttaataga tgcaaaaaac actgatatta aagtttatag agtcgataat 1320

gctaatgatt tatctgaaag ttattatgtg aatcctagcg attttgaaga tgtaactaat 1380

caagttagaa tttcatttcc aaatgctaat caatacaaag tagaatttcc tacggacgat 1440

gaccaaatta caacaccgta tattgtagtt gttaatggcc atattgatcc tgctagtaca 1500

ggtgatttag cactacgttc gacattttat ggttatgatt ctaattttat atggagatct 1560

atgtcatggg acaacgaagt agcatttaat aacggatcag gttctggtga cggtatcgat 1620

aaaccagttg ttcctgaaca acctgatgag cctggtgaaa ttgaaccaat tccagag 1677

<210> 64
<211> 559
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 64

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

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

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

  Ser Ala Ser Asn Glu Ser Lys Ser Asn Asp Ser Ser Ser Val Ser Ala
     50                  55                  60

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

  Asn Thr Asn Asn Gly Glu Thr Ser Val Ala Gln Asn Pro Ala Gln Gln
                 85                  90                  95

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

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

  Ala Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln
     130                 135                 140

  Thr Ser Asn Glu Thr Thr Ser Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val
 145                 150                 155                 160

  Asn Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln
                 165                 170                 175

  Asp Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln
             180                 185                 190

  Asn Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Ser Gln Ala Val Asn Pro
         195                 200                 205

  Ser Thr Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp
     210                 215                 220

  Ala Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asp Val Lys
 225                 230                 235                 240

  Val Thr Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr
                 245                 250                 255

  Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly
             260                 265                 270
```

```
Asp Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val
        275                 280                 285

Thr Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu
    290                 295                 300

Ala Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr
305                 310                 315                 320

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

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

Thr Thr Gly Ile Gly Thr Asn Thr Ala Ser Lys Thr Val Leu Ile Asp
        355                 360                 365

Tyr Glu Lys Tyr Gly Gln Phe His Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile
    370                 375                 380

Asp Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val
385                 390                 395                 400

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

Ile Pro Asn Thr Lys Ser Asn Ala Leu Ile Asp Ala Lys Asn Thr Asp
            420                 425                 430

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

Tyr Val Asn Pro Ser Asp Phe Glu Asp Val Thr Asn Gln Val Arg Ile
    450                 455                 460

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

Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp
                485                 490                 495

Pro Ala Ser Thr Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Phe Tyr Gly Tyr
            500                 505                 510

Asp Ser Asn Phe Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala
```

515 520 525

Phe Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val
530 535 540

Pro Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
545 550 555

<210> 65
<211> 1677
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 65

atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60

gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120

gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180

agcgttagtg ctgcacctaa aacagacgac acaaacgtga gtgatactaa aacatcgtca 240

aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300

tcatcatcaa caaatgcaac tacggaagaa acgccggtaa ctggtgaagc tactactacg 360

acaacgaatc aagctaatac accggcaaca actcaatcaa gcaatacaaa tgcggaggaa 420

ttagtgaatc aaacaagtaa tgaaacgact tctaatgata ctaatacagt atcatctgta 480

aattcacctc aaaattctac aaatgcggaa aatgtttcaa caacgcaaga tacttcaact 540

gaagcaacac cttcaaacaa tgaatcagct ccacagagta cagatgcaag taataaagat 600

gtagttaatc aagcggttaa tacaagtgcg cctagaatga gagcatttag tttagcggca 660

gtagctgcag atgcaccggc agctggcaca gatattacga atcagttgac gaatgtgaca 720

gttggtattg actctggtac gactgtgtat ccgcaccaag caggttatgt caaactgaat 780

tatggttttt cagtgcctaa ttctgctgtt aaaggtgaca cattcaaaat aactgtacct 840

aaagaattaa acttaaatgg tgtaacttca actgctaaag tgccaccaat tatggctgga 900

gatcaagtat tggcaaatgg tgtaatcgat agtgatggta atgttattta tacatttaca 960

gactatgtaa atactaaaga tgatgtaaaa gcaactttga ccatgcccgc ttatattaac 1020

cctgaaaatg ttaaaaagac aggtaatgtg acattggcta ctggcatagg tagtacaaca 1080

gcaaacaaaa cagtattagt agattatgaa aaatatggta agttttataa cttatctatt 1140

aaaggtacaa ttgaccaaat cgataaaaca aataatacgt atcgtcagac aatttatgtc 1200

aatccaagtg gagataacgt tattgcgccg gttttaacag gtaatttaaa accaaatacg 1260

gatagtaatg cattaataga tcagcaaaat acaagtatta aagtatataa agtagataat 1320

gcagctgatt tatctgaaag ttactttgtg aatccagaaa actttgagga tgtcactaat 1380

agtgtgaata ttacattccc aaatccaaat caatataaag tagagtttaa tacgcctgat 1440

gatcaaatta caacaccgta tatagtagtt gttaatggtc atattgatcc gaatagcaaa 1500

ggtgatttag ctttacgttc aactttatat gggtataact cgaatataat ttggcgctct 1560

atgtcatggg acaacgaagt agcatttaat aacggatcag gttctggtga cggtatcgat 1620

aaaccagttg ttcctgaaca acctgatgag cctggtgaaa ttgaaccaat tccagag 1677

<210> 66
<211> 559
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 66

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

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

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

Ser Ala Ser Asn Glu Ser Lys Ser Asn Asp Ser Ser Ser Val Ser Ala
    50                  55                  60

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

Asn Thr Asn Asn Gly Glu Thr Ser Val Ala Gln Asn Pro Ala Gln Gln
                85                  90                  95

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

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

Ala Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln
    130                 135                 140

Thr Ser Asn Glu Thr Thr Ser Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val
145                 150                 155                 160

Asn Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln
                165                 170                 175

Asp Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln
```

```
            180                 185                 190

Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr
        195                 200                 205

Ser Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp
    210                 215                 220

Ala Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asn Val Thr
225                 230                 235                 240

Val Gly Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr
                245                 250                 255

Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly
            260                 265                 270

Asp Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val
        275                 280                 285

Thr Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu
    290                 295                 300

Ala Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr
305                 310                 315                 320

Asp Tyr Val Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Met Pro
                325                 330                 335

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

Ala Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp
        355                 360                 365

Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile
    370                 375                 380

Asp Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val
385                 390                 395                 400

Asn Pro Ser Gly Asp Asn Val Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu
                405                 410                 415

Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser
            420                 425                 430
```

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

Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile
    450                 455                 460

Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro Asp
465                 470                 475                 480

Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Asn Gly His Ile Asp
                485                 490                 495

Pro Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr
            500                 505                 510

Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala
        515                 520                 525

Phe Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val
    530                 535                 540

Pro Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
545                 550                 555
```

<210> 67
<211> 1677
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 67

atgaatatga agaaacaaga aaaacacgca attcgtaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60

gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120

gaaaatagta tgacacaaac ggaaaatacg agtaatgaga gcaaaagtaa tgatccaagt 180

agcgttaatg ctgcacctaa aacagacaac acaaacgtga gtgattctaa tacaacgaca 240

aacactaata gtgacgaaac gaatgtagcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300

tcagcatcaa caaatgcaac tacagaagaa acaccggtaa ctggtgaagt tactactacg 360

gcaacgaatc aagctaatac accggcaaca actcaatcaa gcaatacaaa tgcggaagaa 420

tcagtgaatc aaacaagtaa tgaaacgact tctaatgata ctaatacagt atcatctgta 480

aattcacctc aaaattctac aaatgcggaa aatgtttcaa caacgcaaga catttcaact 540

gaagcaacac cttcaaacaa tgaatcagct ccacagagta cagatgcaag taataaagat 600

gtagttaatc aagcggttaa tacaagtgcg cctagaatga gagcatttag tttagcggct 660

gtagctgcag atgcaccggc tgctggcaaa gatattacga atcagttgac gaatgtgaca 720

gttggtattg actctggaga tacagtttat ccgcaccaag caggctatgt caaactgaat 780

tatgggttct cagtaccaaa tgaggctgtt caaggtgaca cattcaaaat aactgtgccc 840

aaagaattaa acttaaatgg tgtaacttca actgctaaag tgccaccaat tatggccgga 900

gatcaagtat tggcaaatgg tgtaatcgat agtgatggta atgttattta tacatttaca 960

gactatgtaa atactaaaga tgatgttaaa gcaactttga ccatgcccgc ttatattgac 1020

cctgaaaatg ttacaaagac aggtaatgtg acattggcta ctggcatagg tagtacaaca 1080

gcaaacaaaa cagtattagt agattatgaa aaatatggta agttttataa cttatctatt 1140

aaaggtacaa ttgaccaaat cgataaaaca aataatacgt atcgtcagac aatttatgtc 1200

aatccaagtg gagataacgt tattgcgccg gttttaacag gtaatttaaa accaaatacg 1260

gatagtaatg cattaataga tgcacaaaat actagtatta aagtatataa agttgataat 1320

gcatcagact tgtctgaaag ttattatgtg aatccagata actttgaaga tgtcactgat 1380

agtgtgaata ttacattccc aaatccaaat caatataaag tagagttcaa tacgcctgat 1440

gatcaaataa caacaccata tattgtagtt gttaatgggc atattgatcc taatagtaaa 1500

ggtgatttag ctttacgttc aactttatat ggatataatt cgaatataat ttggcgatca 1560

atgtcatggg ataatgaagt agcatttaat aacggatcag gttctggtga cggtatcgat 1620

aaacctgttg ttcctgaaca acctgatgag ccgggtgaaa ttgaaccaat tccagag 1677

<210> 68
<211> 559
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 68

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

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

Ser Ser Lys Glu Ala Asp Ala Ser Glu Asn Ser Met Thr Gln Thr Glu
        35                  40                  45

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

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

Asn Thr Asn Ser Asp Glu Thr Asn Val Ala Gln Asn Pro Ala Gln Gln
                85                  90                  95
```

```
Glu Thr Thr Gln Ser Ala Ser Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro
            100                 105                 110

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

Ala Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Ser Val Asn Gln
    130                 135                 140

Thr Ser Asn Glu Thr Thr Ser Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val
145                 150                 155                 160

Asn Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln
                165                 170                 175

Asp Ile Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln
            180                 185                 190

Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr
        195                 200                 205

Ser Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp
    210                 215                 220

Ala Pro Ala Ala Gly Lys Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asn Val Thr
225                 230                 235                 240

Val Gly Ile Asp Ser Gly Asp Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr
                245                 250                 255

Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Glu Ala Val Gln Gly
            260                 265                 270

Asp Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val
        275                 280                 285

Thr Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu
    290                 295                 300

Ala Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr
305                 310                 315                 320

Asp Tyr Val Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Met Pro
                325                 330                 335

Ala Tyr Ile Asp Pro Glu Asn Val Thr Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu
            340                 345                 350
```

```
Ala Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp
        355                 360                 365

Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile
    370                 375                 380

Asp Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val
385                 390                 395                 400

Asn Pro Ser Gly Asp Asn Val Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu
                405                 410                 415

Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Ala Gln Asn Thr Ser
            420                 425                 430

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

Tyr Val Asn Pro Asp Asn Phe Glu Asp Val Thr Asp Ser Val Asn Ile
    450                 455                 460

Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro Asp
465                 470                 475                 480

Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp
                485                 490                 495

Pro Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr
            500                 505                 510

Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala
        515                 520                 525

Phe Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val
    530                 535                 540

Pro Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
545                 550                 555
```

<210> 69
<211> 1677
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 69

atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60

gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120

gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180

agcattaatg ctgcacctaa aacagacaac acaaacgtga gtgatactaa accaacgtca 240

aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300

tcagcatcaa caaatgcaac tacggaagaa acgccggtaa ctggtgaagc tactactacg 360

acaacgaatc aagctaatac accggcaaca actcaatcaa gcaatacaaa tgcggaggaa 420

ttagtgaatc aaacaagtaa tgaaacgact tctaatgata ctaatacagt atcatctgta 480

aattcacctc aaaattctac aaatgcggaa aatgtttcaa caacgcaaga tacttcaact 540

gaagcaacac cttcaaacaa tgaatcagct ccacagagta cagatgcaag taataaagat 600

gtagttaatc aagcggttaa tacaagtgcg cctagaaaga gagcatttag tttagcggct 660

gtagctgcag atgcaccggc agctggcaca gatattacga atcagttgac agatgtgaaa 720

gttactattg actctggtac gactgtgtat ccgcaccaag caggttatgt caaactgaat 780

tatggttttt cagtgcctaa ttctgctgtt aaaggtgaca cattcaaaat aactgtacct 840

aaagaattaa acttaaatgg tgtaacttca actgctaaag tgccaccaat tatggctgga 900

gatcaagtat tggcaaatgg tgtaatcgat agtgatggta atgttattta tacatttaca 960

gactatgttg ataataaaga aaatgtaaca gctaatatta ctatgccagc ttatattgac 1020

cctgaaaatg ttacaaagac aggtaatgtg acattgacaa ctggcatagg aaccaatact 1080

gctagtaaga cagtattaat cgactatgag aaatatggac aattccataa tttatcaatt 1140

aaaggtacga ttgatcaaat cgataaaaca aataatacgt atcgccaaac aatttatgtc 1200

aatccaagcg gagataacgt tgtgttacct gccttaacag gtaatttaat tcctaataca 1260

aagagtaatg cgttaataga tgcaaaaaac actgatatta aagtttatag agtcgataat 1320

gctaatgatt tatctgaaag ttattatgtg aatcctagcg attttgaaga tgtaactaat 1380

caagttagaa tttcatttcc aaatgctaat caatacaaag tagaatttcc tacggacgat 1440

gaccaaatta caacaccgta tattgtagtt gttaatggcc atattgatcc tgctagtaca 1500

ggtgatttag cactacgttc gacattttat ggttatgatt ctaattttat atggagatct 1560

atgtcatggg acaacgaagt agcatttaat aacggatcag gttctggtga cggtatcgat 1620

aaaccagttg ttcctgaaca acctgatgag cctggtgaaa ttgaaccaat tccagag 1677

<210> 70
<211> 559
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 70

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

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

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

   Ser Ala Ser Asn Glu Ser Lys Ser Asn Asp Ser Ser Ser Ile Asn Ala
       50                  55                  60

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

   Asn Thr Asn Asn Gly Glu Thr Ser Val Ala Gln Asn Pro Ala Gln Gln
                   85                  90                  95

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

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

   Ala Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln
       130                 135                 140

   Thr Ser Asn Glu Thr Thr Ser Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val
   145                 150                 155                 160

   Asn Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln
                   165                 170                 175

   Asp Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln
               180                 185                 190

   Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr
           195                 200                 205

   Ser Ala Pro Arg Lys Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp
       210                 215                 220

   Ala Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asp Val Lys
   225                 230                 235                 240

   Val Thr Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr
                   245                 250                 255

   Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly
               260                 265                 270
```

```
Asp Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val
        275                 280                 285

Thr Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu
    290                 295                 300

Ala Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr
305                 310                 315                 320

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

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

Thr Thr Gly Ile Gly Thr Asn Thr Ala Ser Lys Thr Val Leu Ile Asp
        355                 360                 365

Tyr Glu Lys Tyr Gly Gln Phe His Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile
    370                 375                 380

Asp Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val
385                 390                 395                 400

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

Ile Pro Asn Thr Lys Ser Asn Ala Leu Ile Asp Ala Lys Asn Thr Asp
            420                 425                 430

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

Tyr Val Asn Pro Ser Asp Phe Glu Asp Val Thr Asn Gln Val Arg Ile
    450                 455                 460

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

Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp
                485                 490                 495

Pro Ala Ser Thr Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Phe Tyr Gly Tyr
            500                 505                 510

Asp Ser Asn Phe Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala
```

515 520 525

Phe Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val
530 535 540

Pro Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
545 550 555

<210> 71
<211> 1677
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 71

atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60

gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120

gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180

agcgttagtg ctgcacctaa aacagacgac acaaacgtga gtgatactaa aacatcgtca 240

aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300

tcatcatcaa caaatgcaac tacggaagaa acgccggtaa ctggtgaagc tactactacg 360

acaacgaatc aagctaatac accggcaaca actcaatcaa gcaatacaaa tgcggaggaa 420

ttagtgaatc aaacaagtaa tgaaacgact tctaatgata ctaatacagt atcatctgta 480

aattcacctc aaaattctac aaatgcggaa aatgtttcaa caacgcaaga tacttcaact 540

gaagcaacac cttcaaacaa tgaatcagct ccacagaata cagatgcaag taataaagat 600

gtagttagtc aagcggttaa tccaagtacg cctagaatga gagcatttag tttagcggca 660

gtagctgcag atgcaccggc agctggcaca gatattacga atcagttgac agatgtgaaa 720

gttactattg actctggtac gactgtgtat ccgcaccaag caggttatgt caaactgaat 780

tatggttttt cagtgcctaa ttctcctgtt aaaggtgaca cattcaaaat aactgtacct 840

aaagaattaa acttaaatgg tgtaacttca actgctaaag tgccaccaat tatggctgga 900

gatcaagtat tggcaaatgg tgtaatcgat agtgatggta atgttattta tacatttaca 960

gactatgttg ataataaaga aaatgtaaca gctaatatta ctatgccagc ttatattgac 1020

cctgaaaatg ttacaaagac aggtaatgtg acattgacaa ctggcatagg aaccaatact 1080

gctagtaaga cagtattaat cgactatgag aaatatggac aattccataa tttatcaatt 1140

aaaggtacga ttgatcaaat cgataaaaca aataatacgt atcgccaaac aatttatgtc 1200

aatccaagcg gagataacgt tgtgttacct gccttaacag gtaatttaat tcctaataca 1260

aagagtaatg cgttaataga tgcaaaaaac actgatatta aagtttatag agtcgataat 1320

gctaatgatt tatctgaaag ttattatgtg aatcctagcg attttgaaga tgtaactaat 1380

caagttagaa tttcatttcc aaatgctaat caatacaaag tagaatttcc tacggacgat 1440

gaccaaatta caacaccgta tattgtagtt gttaatggcc atattgatcc tgctagtaca 1500

ggtgatttag cactacgttc gacattttat ggttatgatt ctaattttat atggagatct 1560

atgtcatggg acaacgaagt agcatttaat aacggatcag gttctggtga cggtatcgat 1620

aaaccagttg ttcctgaaca acctgatgag cctggtgaaa ttgaaccaat tccagag 1677

<210> 72
<211> 559
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 72

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

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

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

Ser Ala Ser Asn Glu Ser Lys Ser Asn Asp Ser Ser Ser Val Ser Ala
    50                  55                  60

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

Asn Thr Asn Asn Gly Glu Thr Ser Val Ala Gln Asn Pro Ala Gln Gln
                85                  90                  95

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

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

Ala Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln
    130                 135                 140

Thr Ser Asn Glu Thr Thr Ser Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val
145                 150                 155                 160

Asn Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln
                165                 170                 175

Asp Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln
```

```
            180                 185                 190

Asn Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Ser Gln Ala Val Asn Pro
        195                 200                 205

Ser Thr Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp
    210                 215                 220

Ala Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asp Val Lys
225                 230                 235                 240

Val Thr Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr
                245                 250                 255

Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Pro Val Lys Gly
            260                 265                 270

Asp Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val
        275                 280                 285

Thr Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu
    290                 295                 300

Ala Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr
305                 310                 315                 320

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

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

Thr Thr Gly Ile Gly Thr Asn Thr Ala Ser Lys Thr Val Leu Ile Asp
        355                 360                 365

Tyr Glu Lys Tyr Gly Gln Phe His Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile
    370                 375                 380

Asp Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val
385                 390                 395                 400

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

Ile Pro Asn Thr Lys Ser Asn Ala Leu Ile Asp Ala Lys Asn Thr Asp
            420                 425                 430
```

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

Tyr Val Asn Pro Ser Asp Phe Glu Asp Val Thr Asn Gln Val Arg Ile
    450                 455                 460

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

Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp
                485                 490                 495

Pro Ala Ser Thr Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Phe Tyr Gly Tyr
            500                 505                 510

Asp Ser Asn Phe Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala
        515                 520                 525

Phe Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val
    530                 535                 540

Pro Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
545                 550                 555
```

<210> 73
<211> 1677
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 73

atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60

gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120

gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180

agcattaatg ctgcacctaa aacagacaac acaaacgtga gtgatactaa aacaacgtca 240

aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300

tcagcatcaa caaatgcaac tacggaagaa acgccggtaa ctggtgaaac tactactacg 360

gcaacgaatc aagctaatac accggcaaca actcaatcaa gcaatacaaa tgcggaggaa 420

ttagtgaatc aaacaagtaa tgaaacgact tctaatgata ctaatacagt atcatctgta 480

aattcacctc aaaattctac aaatgcggaa aatgtttcaa caacgcaaga tacttcaact 540

gaagcaacac cttcaaacaa tgaatcagct ccacagagta cagatgcaag taataaagat 600

gtagttaatc aagcggttaa tacaagtgcg cctagaatga gagcatttag tttagcggca 660

gtagctgcag atgcaccggc agctggcaca gatattacga atcagttgac agatgtgaaa 720

gttactattg actctggtac gactgtgtat ccgcaccaag caggttatgt caaactgaat 780

tatggttttt cagtgcctaa ttctgctgtt aaaggtgaca cattcaaaat aactgtacct 840

aaagaattaa acttaaatgg tgtaacttca actgctaaag tgccaccaat tatggctgga 900

gatcaagtat tggcaaatgg tgtaatcgat agtgatggta atgttattta tacatttaca 960

gactatgttg ataataaaga aaatgtaaca gctaatatta ctatgccagc ttatattgac 1020

cctgaaaatg ttacaaagac aggtaatgtg acattgacaa ctggcatagg aaccaatact 1080

gctagtaaga cagtattaat cgactatgag aaatatggac aattccataa tttatcaatt 1140

aaaggtacga ttgatcaaat cgataaaaca aataatacgt atcgccaaac aatttatgtc 1200

aatccaagcg gagataacgt tgtgttacct gccttaacag gtaatttaat tcctaataca 1260

aagagtaatg cgttaataga tgcaaaaaac actgatatta aagtttatag agtcgataat 1320

gctaatgatt tatctgaaag ttattatgtg aatcctagcg attttgaaga tgtaactaat 1380

caagttagaa tttcatttcc aaatgctaat caatacaaag tagaatttcc tacggacgat 1440

gaccaaatta caacaccgta tattgtagtt gttaatggcc atattgatcc tgctagtaca 1500

ggtgatttag cactacgttc gacattttat ggttatgatt ctaattttat atggagatct 1560

atgtcatggg acaacgaagt agcatttaat aacggatcag gttctggtga cggtatcgat 1620

aaaccagttg ttcctgaaca acctgatgag cctggtgaaa ttgaaccaat tccagag 1677

<210> 74
<211> 559
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 74

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

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

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

Ser Ala Ser Asn Glu Ser Lys Ser Asn Asp Ser Ser Ser Ile Asn Ala
    50                  55                  60

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

Asn Thr Asn Asn Gly Glu Thr Ser Val Ala Gln Asn Pro Ala Gln Gln
                85                  90                  95
```

```
Glu Thr Thr Gln Ser Ala Ser Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro
            100                 105                 110

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

Ala Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln
    130                 135                 140

Thr Ser Asn Glu Thr Thr Ser Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val
145                 150                 155                 160

Asn Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln
                165                 170                 175

Asp Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln
            180                 185                 190

Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr
        195                 200                 205

Ser Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp
    210                 215                 220

Ala Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asp Val Lys
225                 230                 235                 240

Val Thr Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr
                245                 250                 255

Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly
            260                 265                 270

Asp Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val
        275                 280                 285

Thr Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu
    290                 295                 300

Ala Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr
305                 310                 315                 320

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

Ala Tyr Ile Asp Pro Glu Asn Val Thr Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu
            340                 345                 350
```

```
Thr Thr Gly Ile Gly Thr Asn Thr Ala Ser Lys Thr Val Leu Ile Asp
        355                 360                 365

Tyr Glu Lys Tyr Gly Gln Phe His Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile
    370                 375                 380

Asp Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val
385                 390                 395                 400

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

Ile Pro Asn Thr Lys Ser Asn Ala Leu Ile Asp Ala Lys Asn Thr Asp
            420                 425                 430

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

Tyr Val Asn Pro Ser Asp Phe Glu Asp Val Thr Asn Gln Val Arg Ile
    450                 455                 460

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

Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp
                485                 490                 495

Pro Ala Ser Thr Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Phe Tyr Gly Tyr
            500                 505                 510

Asp Ser Asn Phe Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala
        515                 520                 525

Phe Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val
    530                 535                 540

Pro Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
545                 550                 555
```

<210> 75
<211> 1677
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 75

atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60

gtgcttgtag gtacgttaat cggtttcgga ttacttagca gtaaagaagc agatgcaagt 120

gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180

agcgttaatg ctgcacctaa aacagacaac acaaacgtga gtgatactaa aacaacgtca 240

aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacagga aacgatacaa 300

tcagcatcaa caaatgcaac tacggaagaa acaccggtaa ctggtgaagc tactactacg 360

gcaacgaagc aagctaatac accggcaaca actcaatcaa gcaatacaaa tgcggaggaa 420

ttagtgaatc aaacaagtaa tgaaacgact tctaatgata ctaatacagt atcatctgta 480

aattcacctc aaaattctac aaatgcggaa aatgtttcaa caacgcaaga tacttcaact 540

gaagcaacac cttcaaacaa tgaatcagct ccacagagta cagatgcaag taataaagat 600

gtagttaatc aagcggttaa tacaagtgcg cctagaatga gagcatttag tttagcggct 660

gtagctgcag atgcaccggc tgctggcaca gatattacga atcagttgac agatgtgaaa 720

gttactattg actctggtac gactgtgtat ccgcaccaag caggttatgt caaactgaat 780

tatggttttt cagtgcctaa ttctgctgtt aaaggtgaca cattcaaaat aactgtacct 840

aaagaattaa acttaaatgg tgtaacttca actgctaaag tgccaccaat tatggccgga 900

gatcaagtat tggcaaatgg tgtaatcgat agtgatggta atgttattta tacatttaca 960

gactatgtaa atactaaaga tgatgttaaa gcaactttga ccatgcccgc ttatattgac 1020

cctgaaaatg ttacaaagac aggtaatgtg acattggcta ctggcatagg tagtacaaca 1080

gcaaacaaaa cagtattagt agattatgaa aaatatggta agttttataa cttatctatt 1140

aaaggtacaa ttgaccaaat cgataaaaca aataatacgt atcgtcagac aatttatgtc 1200

aatccaagtg gagataacgt tattgcgccg gttttaacag gtaatttaaa accaaatacg 1260

gatagtaatg cattaataga tcagcaaaat acaagtatta aagtatataa agtagataat 1320

gcagctgatt tatctgaaag ttactttgtg aatccagaaa actttgagga tgtcactaat 1380

agtgtgaata ttacattccc aaatccaaat caatataaag tagagtttaa tacgcctgat 1440

gatcaaatta caacaccgta tattgtagtt gttaatggtc atattgatcc gaatagcaaa 1500

ggtgatttag ctttacgttc aactttatat gggtatgact caaggtttgt atggagatct 1560

atgtcatggg acaacgaagt agcatttaat aacggatcag gttctggtga cggtatcgat 1620

aaaccagttg ttcctgaaca acctgatgag cctggtgaaa ttgaaccaat tccagag 1677

<210> 76
<211> 559
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 76

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

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

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

   Ser Ala Ser Asn Glu Ser Lys Ser Asn Asp Ser Ser Ser Val Asn Ala
       50                  55                  60

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

   Asn Thr Asn Asn Gly Glu Thr Ser Val Ala Gln Asn Pro Ala Gln Gln
                   85                  90                  95

   Glu Thr Ile Gln Ser Ala Ser Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro
               100                 105                 110

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

   Ala Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln
       130                 135                 140

   Thr Ser Asn Glu Thr Thr Ser Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val
   145                 150                 155                 160

   Asn Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln
                   165                 170                 175

   Asp Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln
               180                 185                 190

   Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr
           195                 200                 205

   Ser Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp
       210                 215                 220

   Ala Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asp Val Lys
   225                 230                 235                 240

   Val Thr Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr
                   245                 250                 255

   Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly
               260                 265                 270
```

```
Asp Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val
        275                 280                 285

Thr Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu
    290                 295                 300

Ala Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr
305                 310                 315                 320

Asp Tyr Val Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Met Pro
                325                 330                 335

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

Ala Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp
        355                 360                 365

Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile
    370                 375                 380

Asp Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val
385                 390                 395                 400

Asn Pro Ser Gly Asp Asn Val Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu
                405                 410                 415

Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser
            420                 425                 430

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

Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile
    450                 455                 460

Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro Asp
465                 470                 475                 480

Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp
                485                 490                 495

Pro Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr
            500                 505                 510

Asp Ser Arg Phe Val Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala
```

515 520 525

Phe Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val
530 535 540

Pro Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
545 550 555

<210> 77
<211> 1677
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 77

atgaatatga agaaacaaga aaaacacgca attcgtaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60

gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120

gaaaatagtg ttacgcaaac ggaaaatacg agtaatgaga gcaaaagtaa tgattcgagt 180

agcgttaatg ctgcacctaa aacagacaac acaaacgtga gtgattctaa tacaacgaca 240

aacactaata gtgacgaaac gaatgtagcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300

tcagcatcaa caaatgcaac tacagaagaa acaccggtaa ctggtgaagt tactactacg 360

gcaacgaatc aagctaatac accggcaaca actcaatcaa gcaatacaaa tgcggaaaaa 420

tcagtgaatc aaacaagtaa tgaaacgact tctaatgata ctaatacagt atcatctgta 480

aattcacctc aaaattctac aaatgcggaa aatgtttcaa caacgcaaga tacttcaact 540

gaagcaaaac cttcaaacaa tgaatcagct ccacagagta cagatgcaag taataaagat 600

gtagttaatc aagcggttaa tacaagtgcg cctagaatga gagcatttag tttagcggct 660

gtagctgcag atgcaccggc tgctggcaca gatattacga atcagttgac gaatgtgaca 720

gttggtattg actctggaga tacagtttat ccgcaccaag caggctatgt caaactgaat 780

tatgggttct cagtacccaa ttctgcggtt caaggtgaca catttaaaat aactgtacct 840

aaagaattaa acttaaatgg tgtaacctca actgctaaag tgccaccaat tatggccgga 900

gatcaagtat tggcaaatgg tgtaatcgat agtgatggta atgttattta tacatttaca 960

gactatgtaa atactaaaga tgatgttaaa gcaacattaa ctgtgccggc ttatattgac 1020

cctgaatatg ttacacatac tggtaatgtg acattggcta ctggcatagg aaatacaaca 1080

gcaaacaaaa cagtattagt agattatgaa aaatatggta agttttataa cttatctatt 1140

aaaggtacaa ttgaccaaat cgataaaaca aataatacgt atcgtcagac aatttatgtc 1200

aatccaagtg gagataacgt tattgcaccg gttttaacag gtaatttaaa accaaatacg 1260

gaaagtaatg cattaataga tcagcaaaat acaagtatta aagtatataa agtagataat 1320

gcagctgatt tatctgaaag ttactttgtg aatccagaaa actttgagga tgtcactaat 1380

agtgtaaata ttacattccc aaatccaaat caatataaag tagagtttaa tacgcctgat 1440

gatcaaataa caacaccata tattgtagtt gttaatgggc atattgatcc taatagtaaa 1500

ggtgatttag ctttacgttc aactttatat ggatataatt cgaatataat ttggagatct 1560

atgtcatggg acaacgaagt agcatttaat aacggatcag gttctggtga cggtatcgat 1620

aaacctgttg ttcctgaaca acctgatgag cctggtgaaa ttgaaccaat tccagag 1677

<210> 78
<211> 559
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 78

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

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

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

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

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

Asn Thr Asn Ser Asp Glu Thr Asn Val Ala Gln Asn Pro Ala Gln Gln
                85                  90                  95

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

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

Ala Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Lys Ser Val Asn Gln
    130                 135                 140

Thr Ser Asn Glu Thr Thr Ser Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val
145                 150                 155                 160

Asn Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln
                165                 170                 175

Asp Thr Ser Thr Glu Ala Lys Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln
```

```
            180                 185                 190

Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr
        195                 200                 205

Ser Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp
    210                 215                 220

Ala Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asn Val Thr
225                 230                 235                 240

Val Gly Ile Asp Ser Gly Asp Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr
                245                 250                 255

Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Gln Gly
            260                 265                 270

Asp Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val
        275                 280                 285

Thr Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu
    290                 295                 300

Ala Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr
305                 310                 315                 320

Asp Tyr Val Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Val Pro
                325                 330                 335

Ala Tyr Ile Asp Pro Glu Tyr Val Thr His Thr Gly Asn Val Thr Leu
            340                 345                 350

Ala Thr Gly Ile Gly Asn Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp
        355                 360                 365

Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile
    370                 375                 380

Asp Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val
385                 390                 395                 400

Asn Pro Ser Gly Asp Asn Val Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu
                405                 410                 415

Lys Pro Asn Thr Glu Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser
            420                 425                 430
```

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

Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile
    450                 455                 460

Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro Asp
465                 470                 475                 480

Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp
                485                 490                 495

Pro Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr
            500                 505                 510

Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala
        515                 520                 525

Phe Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val
    530                 535                 540

Pro Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
545                 550                 555
```

<210> 79
<211> 1677
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 79

atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60

gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120

gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180

agcgttagtg ctgcacctaa aacagacgac acaaacgtga gtgatactaa aacatcgtca 240

aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300

tcatcatcaa caaatgcaac tacggaagaa acgccggtaa ctggtgaagc tactactacg 360

acaacgaatc aagctaatac accggcaaca actcaatcaa gcaatacaaa tgcggaggaa 420

ttagtgaatc aaacaagtaa tgaaacgact tctaatgata ctaatacagt atcatctgta 480

aattcacctc aaaattctac aaatgcggaa aatgtttcaa caacgcaaga tacttcaact 540

gaagcaacac cttcaaacaa tgaatcagct ccacagagta cagatgcaag taataaagat 600

gtagttaatc aagcggttaa tacaagtgcg cctagaatga gagcatttag tttagcggca 660

gtagctgcag atgcaccggt agctggcaca gatattacga atcagttgac gaatgtgaca 720

gttggtattg actctggtac gactgtgtat ccgcaccaag caggttatgt caaactgaat 780

tatggttttt cagtgcctaa ttctgctgtt aaaggtgaca cattcaaaat aactgtacct 840

aaagaattaa acttaaatgg tgtaacttca actgctaaag tgccaccaat tatggctgga 900

gatcaagtat tggcaaatgg tgtaatcgat agtgatggta atgttattta tacatttaca 960

gactatgtaa atactaaaga tgatgtaaaa gcaactttga ccatgcccgc ttatattgac 1020

cctgaaaatg ttaaaaagac aggtaatgtg acattggcta ctggcatagg tagtacaaca 1080

gcaaacaaaa cagtattagt agattatgaa aaatatggta agttttataa cttatctatt 1140

aaaggtacaa ttgaccaaat cgataaaaca aataatacgt atcgtcagac aatttatgtc 1200

aatccaagtg gagataacgt tattgcgccg gttttaacag gtaatttaaa accaaatacg 1260

gatagtaatg cattaataga tcagcaaaat acaagtatta aagtatataa agtagataat 1320

gcagctgatt tatctgaaag ttactttgtg aatccagaaa actttgagga tgtcactaat 1380

agtgtgaata ttacattccc aaatccaaat caatataaag tagagtttaa tacgcctgat 1440

gatcaaatta caacaccgta tatagtagtt gttaatggtc atattgatcc gaatagcaaa 1500

ggtgatttag ctttacgttc aactttatat gggtataact cgaatataat ttggcgctct 1560

atgtcatggg acaacgaagt agcatttaat aacggatcag gttctggtga cggtatcgat 1620

aaaccagttg ttcctgaaca acctgatgag cctggtgaaa ttgaaccaat tccagag 1677

<210> 80
<211> 559
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 80

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

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

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

Ser Ala Ser Asn Glu Ser Lys Ser Asn Asp Ser Ser Ser Val Ser Ala
    50                  55                  60

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

Asn Thr Asn Asn Gly Glu Thr Ser Val Ala Gln Asn Pro Ala Gln Gln
                85                  90                  95
```

```
Glu Thr Thr Gln Ser Ser Ser Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro
            100                 105                 110

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

Ala Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln
    130                 135                 140

Thr Ser Asn Glu Thr Thr Ser Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val
145                 150                 155                 160

Asn Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln
                165                 170                 175

Asp Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln
            180                 185                 190

Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr
        195                 200                 205

Ser Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp
    210                 215                 220

Ala Pro Val Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asn Val Thr
225                 230                 235                 240

Val Gly Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr
                245                 250                 255

Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly
            260                 265                 270

Asp Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val
        275                 280                 285

Thr Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu
    290                 295                 300

Ala Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr
305                 310                 315                 320

Asp Tyr Val Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Met Pro
                325                 330                 335

Ala Tyr Ile Asp Pro Glu Asn Val Lys Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu
            340                 345                 350
```

```
Ala Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp
        355                 360                 365

Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile
    370                 375                 380

Asp Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val
385                 390                 395                 400

Asn Pro Ser Gly Asp Asn Val Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu
                405                 410                 415

Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser
            420                 425                 430

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

Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile
    450                 455                 460

Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro Asp
465                 470                 475                 480

Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp
                485                 490                 495

Pro Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr
            500                 505                 510

Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala
        515                 520                 525

Phe Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val
    530                 535                 540

Pro Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
545                 550                 555
```

<210> 81
<211> 1677
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 81

atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60

gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120

gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180

agcgttagtg ctgcacctaa aacagacgac acaaacgtga gtgatactaa aacatcgtca 240

aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300

tcatcatcaa caaatgcaac tacggaagaa acgccggtaa ctggtgaagc tactactacg 360

acaacgaatc aagctaatac accggcaaca actcaatcaa gcaatacaaa tgcggaggaa 420

ttagtgaatc aaacaagtaa tgaaacgact tttaatgata ctaatacagt atcatctgta 480

aattcacctc aaaattctac aaatgcggaa aatgtttcaa caacgcaaga tacttcaact 540

gaagcaacac cttcaaacaa tgaatcagct ccacagagta cagatgcaag taataaagat 600

gtagttaatc aagcggttaa tacaagtgcg cctagaatga gagcatttag tttagcggca 660

gtagctgcag atgcaccggc agctggcaca gatattacga atcagttgac gaatgtgaca 720

gttggtattg actctggtac gactgtgtat ccgcaccaag caggttatgt caaactgaat 780

tatggttttt cagtgcctaa ttctgctgtt aaaggtgaca cattcaaaat aactgtacct 840

aaagaattaa acttaaatgg tgtaacttca actgctaaag tgccaccaat tatggctgga 900

gatcaagtat tggcaaatgg tgtaatcgat agtgatggta atgttattta tacatttaca 960

gactatgtaa atactaaaga tgatgtaaaa gcaactttga ccatgcccgc ttatattgac 1020

cctgaaaatg ttaaaaagac aggtaatgtg acattggcta ctggcatagg tagtacaaca 1080

gcaaacaaaa cagtattagt agattatgaa aaatatggta agttttataa cttatctatt 1140

aaaggtacaa ttgaccaaat cgataaaaca aataatacgt atcgtcagac aatttatgtc 1200

aatccaagtg gagataacgt tattgcgccg gttttaacag gtaatttaaa accaaatacg 1260

gatagtaatg cattaataga tcagcaaaat acaagtatta aagtatataa agtagataat 1320

gcagctgatt tatctgaaag ttactttgtg aatccagaaa actttgagga tgtcactaat 1380

agtgtgaata ttacattccc aaatccaaat caatataaag tagagtttaa tacgcctgat 1440

gatcaaatta caacaccgta tatagtagtt gttaatggtc atattgatcc gaatagcaaa 1500

ggtgatttag ctttacgttc aactttatat gggtataact cgaatataat ttggcgctct 1560

atgtcatggg acaacgaagt agcatttaat aacggatcag gttctggtga cggtatcgat 1620

aaaccagttg ttcctgaaca acctgatgag cctggtgaaa ttgaaccaat tccagag 1677

<210> 82
<211> 559
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 82

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

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

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

   Ser Ala Ser Asn Glu Ser Lys Ser Asn Asp Ser Ser Ser Val Ser Ala
       50                  55                  60

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

   Asn Thr Asn Asn Gly Glu Thr Ser Val Ala Gln Asn Pro Ala Gln Gln
                   85                  90                  95

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

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

   Ala Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln
       130                 135                 140

   Thr Ser Asn Glu Thr Thr Phe Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val
   145                 150                 155                 160

   Asn Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln
                   165                 170                 175

   Asp Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln
               180                 185                 190

   Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr
           195                 200                 205

   Ser Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp
       210                 215                 220

   Ala Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asn Val Thr
   225                 230                 235                 240

   Val Gly Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr
                   245                 250                 255

   Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly
               260                 265                 270
```

```
Asp Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val
        275                 280                 285

Thr Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu
    290                 295                 300

Ala Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr
305                 310                 315                 320

Asp Tyr Val Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Met Pro
                325                 330                 335

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

Ala Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp
        355                 360                 365

Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile
    370                 375                 380

Asp Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val
385                 390                 395                 400

Asn Pro Ser Gly Asp Asn Val Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu
                405                 410                 415

Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser
            420                 425                 430

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

Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile
    450                 455                 460

Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro Asp
465                 470                 475                 480

Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp
                485                 490                 495

Pro Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr
            500                 505                 510

Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala
```

515 520 525

Phe Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val
530 535 540

Pro Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
545 550 555

<210> 83
<211> 1674
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 83

atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60

gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120

gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180

agcgttagtg ctgcacctaa aacagacgac acaaacgtga gtgatactaa aacatcgtca 240

aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300

tcagcattaa caaatgcaac tacggaagaa actccggtaa ctggtgaagc tactacggca 360

acgaatcaag ctaatacacc ggcaacaact caatcaagca atacaaatgc ggaggaatta 420

gtgaatcaaa caagtaatga aacgacttct aatgatacta atacagtatc atctgtaaat 480

tcacctcaaa attctacaaa tgcggaaaat gtttcaacaa cgcaagatac ttcaactgaa 540

gcaacacctt caaacaatga atcagctcca cagagtacag atgcaagtaa taaagatgta 600

gttaatcaag cggttaatac aagtgcgcct agaatgagag catttagttt atcggcagta 660

gctgcagatg caccggcagc tggcaaagat attacgaatc agttgacgaa tgtgacagtt 720

ggtattgact ctggagatac agtttatccg caccaagcag gctatgtcaa actgaattat 780

ggtttttcag tgcctaattc tgctgttaaa ggtgacacat tcaaaataac tgtacctaaa 840

gaattaaact taaatggtgt aacttcaact gctaaagtgc ctccaattat ggccggagat 900

caagtattgg caaatggtgt aatcgatagt gatggtaatg ttatttatac atttacagac 960

tatgttgata ctaaagaaaa tgtaacagct aatattacta tgccagctta tattgaccct 1020

gaaaatgtta caaagacagg taatgtaaca ttgacaactg gcataggtag tacaacagca 1080

aacaaaacag tattagtaga ttatgaaaaa tatggtaagt tttataactt atctattaaa 1140

ggtacaattg accaaatcga taaaacaaat aatacgtatc gtcagacaat ttatgtcaat 1200

ccaagtggag ataatgttat tgcgccggtt ttaacaggta atttaaaacc aaatacggat 1260

agtaatgcat taatagatca gcaaaataca agtattaaag tatataaagt agataatgca 1320

gctgatttat ctgaaagtta ctttgtgaat ccagaaaact ttgaggatgt cactaatagt 1380

gtgaatatta cattcccaaa tccaaatcaa tataaagtag agtttaatac gcctgatgat 1440

caaattacaa caccgtatat tgtagttgtt aatggtcata ttgatccgaa tagcaaaggt 1500

gatttagctt tacgttcaac tttatatgga tatgactcaa ggtttgtatg gagatctatg 1560

tcatgggaca acgaagtagc atttaataac ggatcaggtt ctggtgacgg tatcgataaa 1620

ccagttgttc ctgaacaacc tgatgagcct ggtgaaattg aaccaattcc agag 1674

<210> 84
<211> 558
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 84

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

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

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

Ser Ala Ser Asn Glu Ser Lys Ser Asn Asp Ser Ser Ser Val Ser Ala
    50                  55                  60

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

Asn Thr Asn Asn Gly Glu Thr Ser Val Ala Gln Asn Pro Ala Gln Gln
                85                  90                  95

Glu Thr Thr Gln Ser Ala Leu Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro
            100                 105                 110

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

Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln Thr
    130                 135                 140

Ser Asn Glu Thr Thr Ser Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val Asn
145                 150                 155                 160

Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln Asp
                165                 170                 175

Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln Ser
```

180 185 190

Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr Ser
195 200 205

Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ser Ala Val Ala Ala Asp Ala
210 215 220

Pro Ala Ala Gly Lys Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asn Val Thr Val
225 230 235 240

Gly Ile Asp Ser Gly Asp Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr Val
245 250 255

Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly Asp
260 265 270

Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val Thr
275 280 285

Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu Ala
290 295 300

Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr Asp
305 310 315 320

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

Tyr Ile Asp Pro Glu Asn Val Thr Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu Thr
340 345 350

Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp Tyr
355 360 365

Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile Asp
370 375 380

Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val Asn
385 390 395 400

Pro Ser Gly Asp Asn Val Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu Lys
405 410 415

Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser Ile
420 425 430

```
Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser Tyr Phe
        435                 440                 445

Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile Thr
    450                 455                 460

Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro Asp Asp
465                 470                 475                 480

Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp Pro
                485                 490                 495

Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr Asp
            500                 505                 510

Ser Arg Phe Val Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala Phe
        515                 520                 525

Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val Pro
    530                 535                 540

Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
545                 550                 555
```

<210> 85
<211> 1674
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 85

atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60

gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120

gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180

agcgttagtg ctgcacctaa aacagacgac acaaacgtga gtgatactaa aacatcgtca 240

aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300

tcagcattaa caaatgcaac tacggaagaa actccgttaa ctggtgaagc tactacggca 360

acgaatcaag ctaatacacc ggcaacaact caatcaagca atacaaatgc ggaggaatta 420

gtgaatcaaa caagtaatga aacgacttct aatgatacta atacagtatc atctgtaaat 480

tcacctcaaa attctacaaa tgcggaaaat gtttcaacaa cgcaagatac ttcaactgaa 540

gcaacacctt caaacaatga atcagctcca cagagtacag atgcaagtaa taaagatgta 600

gttaatcaag cggttaatac aagtgcgcct agaatgagag catttagttt agcggcagta 660

gctgcagatg caccggcagc tggcacagat attacgaatc agttgacaga tgtgaaagtt 720

actattgact ctggtacgac tgtgtatccg caccaagcag gttatgtcaa actgaattat 780

ggtttttcag tgcctaattc tgctgttaaa ggtgacacat tcaaaataac tgtacctaaa 840

gaattaaact taaatggtgt aacttcaact gctaaagtgc ctccaattat ggccggagat 900

caagtattgg caaatggtgt aatcgatagt gatggtaatg ttatttatac atttacagac 960

tatgttgata ctaaaaatga tgttaaagca acactaactg tgcctgcata cattgatcca 1020

gaaaatgtta caaagacggg taatgtaaca ttgaaaactg gcataggaac caatactgat 1080

agtaagacag ttttaatcga ctatgagaaa tatggacaat tccataattt atcaattaaa 1140

ggtacgattg atcaaatcga taaaacaaat aatacgtatc gtcaaacaat ttatgtcaat 1200

ccaagcggag ataacgttgt gttacctgcc ttaacaggta atttaattcc taatacaaag 1260

agtaatgcgt taatagatgc aaaaaacact gatattaaag tttatagagt agataatgct 1320

aatgatttat ctgaaagtta ttatgtgaat cctagcgatt ttgaagatgt aactaatcaa 1380

gttagaattt catttccaaa tgctaatcaa tacaaagtag aatttcctac ggacgatgat 1440

caaattacaa caccgtatat tgtagttgtt aatggccata ttgatcctgc tagcacaggt 1500

gatttagcac tacgttcgac attttatggt tatgattcta attttatatg gagatctatg 1560

tcatgggaca acgaagtagc atttaataac ggatcaggtt caggtgacgg tatcgataaa 1620

cctgttgttc ctgaacaacc tgatgagcct ggtgaaattg aaccaattcc agag 1674

<210> 86
<211> 558
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 86

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

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

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

Ser Ala Ser Asn Glu Ser Lys Ser Asn Asp Ser Ser Ser Val Ser Ala
    50                  55                  60

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

Asn Thr Asn Asn Gly Glu Thr Ser Val Ala Gln Asn Pro Ala Gln Gln
                85                  90                  95
```

```
Glu Thr Thr Gln Ser Ala Leu Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro
            100                 105                 110

Leu Thr Gly Glu Ala Thr Thr Ala Thr Asn Gln Ala Asn Thr Pro Ala
        115                 120                 125

Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln Thr
    130                 135                 140

Ser Asn Glu Thr Thr Ser Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val Asn
145                 150                 155                 160

Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln Asp
                165                 170                 175

Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln Ser
            180                 185                 190

Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr Ser
        195                 200                 205

Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp Ala
    210                 215                 220

Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asp Val Lys Val
225                 230                 235                 240

Thr Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr Val
                245                 250                 255

Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly Asp
            260                 265                 270

Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val Thr
        275                 280                 285

Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu Ala
    290                 295                 300

Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr Asp
305                 310                 315                 320

Tyr Val Asp Thr Lys Asn Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Val Pro Ala
                325                 330                 335

Tyr Ile Asp Pro Glu Asn Val Thr Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu Lys
            340                 345                 350
```

```
Thr Gly Ile Gly Thr Asn Thr Asp Ser Lys Thr Val Leu Ile Asp Tyr
        355                 360                 365

Glu Lys Tyr Gly Gln Phe His Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile Asp
    370                 375                 380

Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val Asn
385                 390                 395                 400

Pro Ser Gly Asp Asn Val Val Leu Pro Ala Leu Thr Gly Asn Leu Ile
                405                 410                 415

Pro Asn Thr Lys Ser Asn Ala Leu Ile Asp Ala Lys Asn Thr Asp Ile
            420                 425                 430

Lys Val Tyr Arg Val Asp Asn Ala Asn Asp Leu Ser Glu Ser Tyr Tyr
        435                 440                 445

Val Asn Pro Ser Asp Phe Glu Asp Val Thr Asn Gln Val Arg Ile Ser
    450                 455                 460

Phe Pro Asn Ala Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Pro Thr Asp Asp Asp
465                 470                 475                 480

Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp Pro
                485                 490                 495

Ala Ser Thr Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Phe Tyr Gly Tyr Asp
            500                 505                 510

Ser Asn Phe Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala Phe
        515                 520                 525

Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val Pro
    530                 535                 540

Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
545                 550                 555
```

<210> 87
<211> 1674
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 87

atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60

gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120

gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180

agcgttaatg ctgcacctaa aacagacaac acaaacgtga gtgatactaa aacaacgtca 240

aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caatatctag cacaacagga aacgacacaa 300

tcagtatcaa caaatgcaac tacggaagaa acaccggtaa ctggtgaagc tactacggca 360

acgaatcaag ctaatacacc ggcaacaact caatcaagca atacaaatgc ggaggaatta 420

gtgaatcaaa caagtaatga aacgacttct aatgatacta atacagtatc atctgtaaat 480

tcacctcaaa attctacaaa tgcggaaaat gtttcaacaa cgcaagatac ttcaactgaa 540

gcaacacctt caaacaatga atcagctcca cagagtacag atgcaagtaa taaagatgta 600

gttaatcaag cggttaatac aagtgcgcct agaatgagag catttagttt agcggctgta 660

gctgcagatg caccggcagc tggcacagat attacgaatc agttgacgaa tgtgacagtt 720

ggtattgact ctggtacgac tgtgtatccg caccaagcag gttatgtcaa actgaattat 780

ggtttttcag tgcctaattc tgctgttaaa ggtgacacat tcaaaataac tgtacctaaa 840

gaattaaact taaatggtgt aacttcaact gctaaagtgc ctccaattat ggctggagat 900

caagtattgg caaatggtgt aatcgataat gatggtaatg ttatttatac atttacagac 960

tatgtaaata ctaaagatga tgttaaagca actttgacta tgcccgctta tattgaccct 1020

gaaaatgtta caaagacagg taatgtgaca ttggctactg gcataggtag tacaacagca 1080

aacaaaacag tattagtaga ttatgaaaaa tatggtaagt tttataactt atctattaaa 1140

ggtacaattg accaaatcga taaaacaaat aatacgtatc gtcagacaat ttatgtcaat 1200

ccaagtggag ataacgttat tgcgccggtt ttaacaggta atttaaaacc aaatacggat 1260

agtaatgcat taatagatca gcaaaataca agtattaaag tatataaagt agataatgca 1320

gctgatttat ctgaaagtta ctttgtgaat ccagaaaact ttgaggatgt cactaatagt 1380

gtgaatatta cattcccaaa tccaaatcaa tataaagtag agtttccaac agacgatgat 1440

caaattacaa caccgtatat tgtagttgtt aatggtcata ttgatccgaa tagcaaaggt 1500

gatttagctt tacgttcaac tttatatggg tataactcga atataatttg gcgctctatg 1560

tcatgggaca acgaagtagc atttaataac ggatcaggtt ctggtgacgg tatcgataaa 1620

cctgttgttc ctgaacaacc tgatgagcct ggtgaaattg aaccaattcc agag 1674

<210> 88
<211> 558
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 88

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

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

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

  Ser Ala Ser Asn Glu Ser Lys Ser Asn Asp Ser Ser Ser Val Asn Ala
     50                  55                  60

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

  Asn Thr Asn Asn Gly Glu Thr Ser Val Ala Gln Tyr Leu Ala Gln Gln
                 85                  90                  95

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

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

  Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln Thr
     130                 135                 140

  Ser Asn Glu Thr Thr Ser Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val Asn
  145                 150                 155                 160

  Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln Asp
                 165                 170                 175

  Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln Ser
             180                 185                 190

  Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr Ser
         195                 200                 205

  Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp Ala
     210                 215                 220

  Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asn Val Thr Val
  225                 230                 235                 240

  Gly Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr Val
                 245                 250                 255

  Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly Asp
             260                 265                 270
```

```
Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val Thr
        275                 280                 285

Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu Ala
    290                 295                 300

Asn Gly Val Ile Asp Asn Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr Asp
305                 310                 315                 320

Tyr Val Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Met Pro Ala
                325                 330                 335

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

Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp Tyr
        355                 360                 365

Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile Asp
    370                 375                 380

Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val Asn
385                 390                 395                 400

Pro Ser Gly Asp Asn Val Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu Lys
                405                 410                 415

Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser Ile
            420                 425                 430

Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser Tyr Phe
        435                 440                 445

Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile Thr
    450                 455                 460

Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Pro Thr Asp Asp Asp
465                 470                 475                 480

Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp Pro
                485                 490                 495

Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr Asn
            500                 505                 510

Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala Phe
```

515 520 525

Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val Pro
530 535 540

Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
545 550 555

<210> 89
<211> 1674
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 89

atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60

gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120

gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180

agcgttagtg ctgcacctaa aacagacgac acaaacgtga gtgatactaa aacatcgtca 240

aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300

tcagcattaa caaatgcaac tacggaagaa actccggtaa ctggtgaagc tactacggca 360

acgaatcaag ctaatacacc ggcaacaact caatcaagca atacaaatgc ggaggaatta 420

gtgaatcaaa caagtaatga aacgacttct aatgatacta atacagtatc atctgtaaat 480

tcacctcaaa attctacaaa tgcggaaaat gtttcaacaa cgcaagatac ttcaactgaa 540

gcaacacctt caaacaatga atcagctcca cagaatacag atgcaagtaa taaagatgta 600

gttaatcaag cggttaatac aagtgcgcct agaaagagag catttagttt agcggctgta 660

gctgcagatg caccggcagc tggcacagat attacgaatc agttgacaga tgtgaaagtt 720

actattgact ctggtacgac tgtgtatccg caccaagcag gttatgtcaa actgaattat 780

ggtttttcag tgcctaattc tgctgttaaa ggtgacacat tcaaaataac tgtacctaaa 840

gaattaaact taaatggtgt aacttcaact gctaaagtgc caccaattat ggctggagat 900

caagtattgg caaatggtgt aatcgatagt gatggtaatg ttatttatac atttacagac 960

tatgttgata ataaagaaaa tgtaacagct aatattacta tgccagctta tattgaccct 1020

gaaaatgtta caaagacagg taatgtgaca ttgacaactg gcataggaac caatactgct 1080

agtaagacag tattaatcga ctatgagaaa tatggacaat tccataattt atcaattaaa 1140

ggtacgattg atcaaatcga taaaacaaat aatacgtatc gccaaacaat ttatgtcaat 1200

ccaagcggag ataacgttgt gttacctgcc ttaacaggta atttaattcc taatacaaag 1260

agtaatgcgt taatagatgc aaaaaacact gatattaaag tttatagagt cgataatgct 1320

aatgatttat ctgaaagtta ttatgtgaat cctagcgatt ttgaagatgt aactaatcaa 1380

gttagaattt catttccaaa tgctaatcaa tacaaagtag aatttcctac ggacgatgac 1440

caaattacaa caccgtatat tgtagttgtt aatggccata ttgatcctgc tagtacaggt 1500

gatttagcac tacgttcgac attttatggt tatgattcta attttatatg gagatctatg 1560

tcatgggaca acgaagtagc atttaataac ggatcaggtt ctggtgacgg tatcgataaa 1620

ccagttgttc ctgaacaacc tgatgagcct ggtgaaattg aaccaattcc agag 1674

<210> 90
<211> 558
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 90

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

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

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

Ser Ala Ser Asn Glu Ser Lys Ser Asn Asp Ser Ser Ser Val Ser Ala
    50                  55                  60

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

Asn Thr Asn Asn Gly Glu Thr Ser Val Ala Gln Asn Pro Ala Gln Gln
                85                  90                  95

Glu Thr Thr Gln Ser Ala Leu Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro
            100                 105                 110

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

Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln Thr
    130                 135                 140

Ser Asn Glu Thr Thr Ser Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val Asn
145                 150                 155                 160

Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln Asp
                165                 170                 175

Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln Asn
```

180 185 190

Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr Ser
195 200 205

Ala Pro Arg Lys Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp Ala
210 215 220

Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asp Val Lys Val
225 230 235 240

Thr Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr Val
245 250 255

Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly Asp
260 265 270

Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val Thr
275 280 285

Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu Ala
290 295 300

Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr Asp
305 310 315 320

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

Tyr Ile Asp Pro Glu Asn Val Thr Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu Thr
340 345 350

Thr Gly Ile Gly Thr Asn Thr Ala Ser Lys Thr Val Leu Ile Asp Tyr
355 360 365

Glu Lys Tyr Gly Gln Phe His Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile Asp
370 375 380

Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val Asn
385 390 395 400

Pro Ser Gly Asp Asn Val Val Leu Pro Ala Leu Thr Gly Asn Leu Ile
405 410 415

Pro Asn Thr Lys Ser Asn Ala Leu Ile Asp Ala Lys Asn Thr Asp Ile
420 425 430

```
Lys Val Tyr Arg Val Asp Asn Ala Asn Asp Leu Ser Glu Ser Tyr Tyr
        435                 440                 445

Val Asn Pro Ser Asp Phe Glu Asp Val Thr Asn Gln Val Arg Ile Ser
    450                 455                 460

Phe Pro Asn Ala Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Pro Thr Asp Asp Asp
465                 470                 475                 480

Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp Pro
                485                 490                 495

Ala Ser Thr Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Phe Tyr Gly Tyr Asp
            500                 505                 510

Ser Asn Phe Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala Phe
        515                 520                 525

Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val Pro
    530                 535                 540

Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
545                 550                 555
```

<210> 91
<211> 1674
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 91

atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60

gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120

gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180

agcgttagtg ctgcacctaa aacagacgac acaaacgtga gtgatactaa aacatcgtca 240

aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300

tcatcattaa caaatgcaac tacggaagaa actccggtaa ctggtgaagc tactacggca 360

acgaatcaag ctaatacacc ggcaacaact caatcaagca atacaaatgc ggaggaatta 420

gtgaatcaaa caagtaatga aacgacttct aatgatacta atacagtatc atctgtaaat 480

tcacctcaaa attctacaaa tgcggaaaat gtttcaacaa cgcaagatac ttcaactgaa 540

gcaacacctt caaacaatga atcagctcca cagagtacag atgcaagtaa taaagattta 600

gttaatcaag cggttaatac aagtgcgcct agaatgagag catttagttt agcggcagta 660

gctgcagatg cacctgcagc tggcacagat attacgaatc agttgacaga tgttaaagtt 720

actattgact ctggtacgac tgtgtatccg caccaagcag gttatgtcaa actgaattat 780

ggtttttcag tgcctaattc tgctgttaaa ggtgacacat tcaaaataac tgtacctaaa 840

gaattaaact taaatggtgt aacttcaact gctaaagtgc caccaattat ggctggagat 900

caagtattgg caaatggtgt aatcgatagt gatggtaatg ttatttatac atttacagac 960

tatgttgata ataaaaacga tgttaaagca actttgacca tgcccgctta tattgatcca 1020

gaaaatgtaa cgaaaacagg taatgtaaca ttgacaactg gcataggtag tacaacagca 1080

aacaaaacag tattagtaga ttatgaaaaa tatggtaagt tttataactt atctattaaa 1140

ggtacaattg accaaatcga taaaacaaat aatacgtatc gtcagacaat ttatgtcaat 1200

ccaagtggag ataacgttat tgcgccggtt ttaacaggta atttaaaacc aaatacggat 1260

agtaatgcat taatagatca gcaaaataca agtattaaag tatataaagt agataatgca 1320

gctgatttat ctgaaagtta ctttgtaaat ccagaaaact ttgaggatgt cactaatagt 1380

gtgaatatta cattcccaaa tccaaatcaa tataaagtag agtttaatac gcctgatgat 1440

caaattacaa caccgtatat tgtagttgtt aatggtcata ttgatccgaa tagcaaaggt 1500

gatttagctt tacgttcaac tttatatggg tataactcga atataatttg gcgctctatg 1560

tcatgggaca acgaagtagc atttaataac ggatcaggtt ctggtgacgg tatcgataaa 1620

cctgttgtcc ctgaacaacc tgatgagcct ggtgaaattg aaccaattcc agag 1674

<210> 92
<211> 558
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 92

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

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

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

Ser Ala Ser Asn Glu Ser Lys Ser Asn Asp Ser Ser Ser Val Ser Ala
    50                  55                  60

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

Asn Thr Asn Asn Gly Glu Thr Ser Val Ala Gln Asn Pro Ala Gln Gln
                85                  90                  95
```

```
Glu Thr Thr Gln Ser Ser Leu Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro
            100                 105                 110

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

Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln Thr
    130                 135                 140

Ser Asn Glu Thr Thr Ser Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val Asn
145                 150                 155                 160

Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln Asp
                165                 170                 175

Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln Ser
            180                 185                 190

Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Leu Val Asn Gln Ala Val Asn Thr Ser
        195                 200                 205

Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp Ala
    210                 215                 220

Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asp Val Lys Val
225                 230                 235                 240

Thr Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr Val
                245                 250                 255

Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly Asp
            260                 265                 270

Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val Thr
        275                 280                 285

Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu Ala
    290                 295                 300

Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr Asp
305                 310                 315                 320

Tyr Val Asp Asn Lys Asn Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Met Pro Ala
                325                 330                 335

Tyr Ile Asp Pro Glu Asn Val Thr Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu Thr
            340                 345                 350
```

```
Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp Tyr
        355                 360                 365

Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile Asp
    370                 375                 380

Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val Asn
385                 390                 395                 400

Pro Ser Gly Asp Asn Val Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu Lys
                405                 410                 415

Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser Ile
            420                 425                 430

Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser Tyr Phe
        435                 440                 445

Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile Thr
    450                 455                 460

Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro Asp Asp
465                 470                 475                 480

Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp Pro
                485                 490                 495

Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr Asn
            500                 505                 510

Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala Phe
        515                 520                 525

Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val Pro
    530                 535                 540

Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
545                 550                 555
```

<210> 93
<211> 1674
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 93

atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60

gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120

gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgatccaagt 180

agcgttaatg ctgcacctaa aacagacaac acaaacgtga gtgatactaa aacatcgtca 240

aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300

tcatcattaa caaatgcaac tacggaagaa actccggtaa ctggtgaagc tactacggca 360

acgaatcaag ctaatacacc ggcaacaact caatcaagca atacaaatgc ggaggaatta 420

gtgaatcaaa caagtaatga aacgacttct aatgatacta atacagtatc atctgtaaat 480

tcacctcaaa attctacaaa tgcggaaaat gtttcaacaa cgcaagatac ttcaactgaa 540

gcaacacctt caaacaatga atcagctcca cagagtacag atgcaagtaa taaagattta 600

gttaatcaag cggttaatac aagtgcgcct agaatgagag catttagttt agcggcagta 660

gctgcagatg cacctgcagc tggcacagat attacgaatc agttgacaga tgttaaagtt 720

actattgact ctggtacgac tgtgtatccg caccaagcag gttatgtcaa actgaattat 780

ggtttttcag tgcctaattc tgctgttaaa ggtgacacat tcaaaataac tgtacctaaa 840

gaattaaact taaatggtgt aacttcaact gctaaagtgc ctccaattat ggccggagat 900

caagtattgg caaatggtgt aatcgatagt gatggtaatg ttatttatac atttacagac 960

tatgttgata ctaaagaaaa tgtaacagct aatattacta tgccagctta tattgaccct 1020

gaaaatgtta caaagacagg taatgtaaca ttgacaactg gcataggtag tacaacagca 1080

aacaaaacag tattagtaga ttatgaaaaa tatggtaagt tttataactt atctattaaa 1140

ggtacaattg accaaatcga taaaacaaat aatacgtatc gtcagacaat ttatgtcaat 1200

ccaagtggag ataacgttat tgcgccggtt ttaacaggta atttaaaacc caatacggat 1260

agtaatgcat taatagatca gcaaaataca agtattaaag tatataaagt agataatgca 1320

gctgatttat ctgaaagtta ctttgtaaat ccagaaaact ttgaggatgt cactaatagt 1380

gtgaatatta cattcccaaa tccaaatcaa tataaagtag agtttaatac gcctgatgat 1440

caaattacaa caccgtatat tgtagttgtt aatggtcata ttgatccgaa tagcaaaggt 1500

gatttagctt tacgttcaac tttatatggg tataactcga atataatttg gcgctctatg 1560

tcatgggaca acgaagtagc atttaataac ggatcaggtt ctggtgacgg tatcgataaa 1620

cctgttgtcc ctgaacaacc tgatgagcct ggtgaaattg aaccaattcc agag 1674

<210> 94
<211> 558
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 94

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

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

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

   Ser Ala Ser Asn Glu Ser Lys Ser Asn Asp Pro Ser Ser Val Asn Ala
      50                  55                  60

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

   Asn Thr Asn Asn Gly Glu Thr Ser Val Ala Gln Asn Pro Ala Gln Gln
                  85                  90                  95

   Glu Thr Thr Gln Ser Ser Leu Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro
              100                 105                 110

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

   Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln Thr
      130                 135                 140

   Ser Asn Glu Thr Thr Ser Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val Asn
   145                 150                 155                 160

   Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln Asp
                  165                 170                 175

   Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln Ser
              180                 185                 190

   Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Leu Val Asn Gln Ala Val Asn Thr Ser
          195                 200                 205

   Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp Ala
      210                 215                 220

   Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asp Val Lys Val
   225                 230                 235                 240

   Thr Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr Val
                  245                 250                 255

   Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly Asp
              260                 265                 270
```

```
Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val Thr
        275                 280                 285

Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu Ala
    290                 295                 300

Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr Asp
305                 310                 315                 320

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

Tyr Ile Asp Pro Glu Asn Val Thr Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu Thr
            340                 345                 350

Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp Tyr
        355                 360                 365

Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile Asp
    370                 375                 380

Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val Asn
385                 390                 395                 400

Pro Ser Gly Asp Asn Val Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu Lys
                405                 410                 415

Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser Ile
            420                 425                 430

Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser Tyr Phe
        435                 440                 445

Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile Thr
    450                 455                 460

Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro Asp Asp
465                 470                 475                 480

Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp Pro
                485                 490                 495

Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr Asn
            500                 505                 510

Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala Phe
```

515 520 525

Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val Pro
530 535 540

Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
545 550 555

<210> 95
<211> 1677
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 95

atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60

gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120

gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180

agcgttagtg ctgcacctaa aacagacgac acaaacgtga gtgatactaa aacatcgtca 240

aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatctag cacaacagga aacgacacaa 300

tcatcatcaa caaatgcaac tacggaagaa acgccggtaa ctggtgaagc tactactacg 360

acaacgaatc aagctaatac accggcaaca actcaatcaa gcaatacaaa tgcggaggaa 420

ttagtgaatc aaacaagtaa tgaaacgact tctaatgata ctaatacagt atcatctgta 480

aattcacctc aaaattctac aaatgcggaa aatgtttcaa caacgcaaga tacttcaact 540

gaagcaacac cttcaaacaa tgaatcagct ccacagagta cagatgcaag taataaagat 600

gtagttaatc aagcggttaa tacaagtgcg cctagaatga gagcatttag tttagcggca 660

gtagctgcag atgcaccggc agctggcaca gatattacga atcagttgac gaatgtgaca 720

gttggtattg actctggtac gactgtgtat ccgcaccaag caggttatgt caaactgaat 780

tatggttttt cagtgcctaa ttctgctgtt aaaggtgaca cattcaaaat aactgtacct 840

aaagaattaa acttaaatgg tgtaacttca actgctaaag tgccaccaat tatggctgga 900

gatcaagtat tggcaaatgg tgtaatcgat agtgatggta atgttattta tacatttaca 960

gactatgtaa atactaaaga tgatgttaaa gcaactttga ccatgcccgc ttatattgac 1020

cctgaaaatg ttacaaagac aggtaatgtg acattggcta ctggcatagg aaatacaaca 1080

gcaaacaaaa cagtattagt agattatgaa aaatatggta agttttataa cttatctatt 1140

aaaggtacaa ttgaccaaat cgataaaaca aataatacgt atcgtcagac aatttatgtc 1200

aatccaagtg gagataacgt tattgcgccg gttttaacag gtaatttaaa accaaatacg 1260

gatagtaatg cattaataga tcagcaaaat acaagtatta aagtatataa agtagataat 1320

gcagctgatt tatctgaaag ttactttgtg aatccagaaa actttgagga tgtcactaat 1380

agtgtgaata ttacattccc aaatccaaat caatataaag tagagtttaa tacgcctgat 1440

gatcaaatta caacaccgta tatagtagtt gttaatggtc atattgatcc gaatagcaaa 1500

ggtgatttag ctttacgttc aactttatat gggtataact cgaatataat ttggcgctct 1560

atgtcatggg acaacgaagt agcatttaat aacggatcag gttctggtga cggtatcgat 1620

aaacctgttg ttcctgaaca acctgatgag cctggtgaaa ttgaaccaat tccagag 1677

<210> 96
<211> 559
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 96

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

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

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

Ser Ala Ser Asn Glu Ser Lys Ser Asn Asp Ser Ser Ser Val Ser Ala
    50                  55                  60

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

Asn Thr Asn Asn Gly Glu Thr Ser Val Ala Gln Asn Leu Ala Gln Gln
                85                  90                  95

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

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

Ala Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln
    130                 135                 140

Thr Ser Asn Glu Thr Thr Ser Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val
145                 150                 155                 160

Asn Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln
                165                 170                 175

Asp Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln
```

```
            180                 185                 190

Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr
        195                 200                 205

Ser Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp
    210                 215                 220

Ala Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asn Val Thr
225                 230                 235                 240

Val Gly Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr
                245                 250                 255

Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly
            260                 265                 270

Asp Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val
        275                 280                 285

Thr Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu
    290                 295                 300

Ala Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr
305                 310                 315                 320

Asp Tyr Val Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Met Pro
                325                 330                 335

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

Ala Thr Gly Ile Gly Asn Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp
        355                 360                 365

Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile
    370                 375                 380

Asp Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val
385                 390                 395                 400

Asn Pro Ser Gly Asp Asn Val Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu
                405                 410                 415

Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser
            420                 425                 430
```

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

Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile
    450                 455                 460

Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro Asp
465                 470                 475                 480

Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Asn Gly His Ile Asp
                485                 490                 495

Pro Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr
            500                 505                 510

Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala
        515                 520                 525

Phe Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val
    530                 535                 540

Pro Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
545                 550                 555
```

<210> 97
<211> 1674
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 97

atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60

gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120

gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180

agcgttagtg ctgcacctaa aacagacgac acaaacgtga gtgatactaa aacatcgtca 240

aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300

tcagcattaa caaatgcaac tacggaagaa actccgttaa ctggtgaagc tactacggca 360

acgaatcaag ctaatacacc ggcaacaact caatcaagca atacaaatgc ggaggaatta 420

gtgaatcaaa caagtaatga aacgacttct aatgatacta atacagtatc atctgtaaat 480

tcacctcaaa attctacaaa tgcggaaaat gtttcaacaa cgcaagatac ttcaactgaa 540

gcaacacctt caaacaatga atcagctcca cagagtacag atgcaagtaa taaagatgta 600

gttaatcaag cggttaatac aagtgcgcct agaatgagag catttagttt agcggcagta 660

gctgcagatg caccggcagc tggcacagat attacgaatc agttgacaga tgtgaaagtt 720

actattgact ctggtacgac tgtgtatccg caccaagcag gttatgtcaa actgaattat 780

ggtttttcag tgcctaattc tgctgttaaa ggtgacacat tcaaaataac tgtacctaaa 840

gaattaaact taaatggtgt aacttcaact gctaaagtgc ctccaattat ggccggagat 900

caagtattgg caaatggtgt aatcgatagt gatggtaatg ttatttatac atttacagac 960

tatgttgata ataaaaacga tgttaaagca acactaactg ttcctgcata cattgatcca 1020

gaaaatgtaa cgaaaacagg taatgtaaca ttgacaactg gcataggaac caatactgct 1080

agtaagacag ttttaatcga ctatgagaaa tatggacaat tccataattt atcaattaaa 1140

ggtacaattg atcaaatcga caaaacaaac aatacgtatc gtcaaacgat ttatgtcaat 1200

ccaagtggag acaatgttgt attaccagtg ttaactggta atctaattcc taagagtaat 1260

agtaatgctt taatagatgc caacaatact aatattaaag tttataaagt ggataatgct 1320

aatgatttat ctgaaagtta ttatgtgaat cctagcgatt ttgaagatgt aactaatcaa 1380

gttagaattt catttccaaa tgctaatcaa tacaaagtag aatttcctac ggacgatgac 1440

caaattacaa caccgtatat tgtagttgtt aatggccata ttgatcctgc tagtacaggt 1500

gatttagcac tacgttcgac attttatggt tatgattcta attttatatg gagatctatg 1560

tcatgggaca acgaagtagc atttaataac ggatcaggtt ctggtgacgg tatcgataaa 1620

ccagttgttc ctgaacaacc tgatgagcct ggtgaaattg aaccaattcc agag 1674

<210> 98
<211> 558
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 98

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

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

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

Ser Ala Ser Asn Glu Ser Lys Ser Asn Asp Ser Ser Ser Val Ser Ala
    50                  55                  60

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

Asn Thr Asn Asn Gly Glu Thr Ser Val Ala Gln Asn Pro Ala Gln Gln
                85                  90                  95
```

```
Glu Thr Thr Gln Ser Ala Leu Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro
            100                 105                 110

Leu Thr Gly Glu Ala Thr Thr Ala Thr Asn Gln Ala Asn Thr Pro Ala
        115                 120                 125

Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln Thr
    130                 135                 140

Ser Asn Glu Thr Thr Ser Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val Asn
145                 150                 155                 160

Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln Asp
                165                 170                 175

Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln Ser
            180                 185                 190

Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr Ser
        195                 200                 205

Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp Ala
    210                 215                 220

Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asp Val Lys Val
225                 230                 235                 240

Thr Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr Val
                245                 250                 255

Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly Asp
            260                 265                 270

Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val Thr
        275                 280                 285

Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu Ala
    290                 295                 300

Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr Asp
305                 310                 315                 320

Tyr Val Asp Asn Lys Asn Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Val Pro Ala
                325                 330                 335

Tyr Ile Asp Pro Glu Asn Val Thr Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu Thr
            340                 345                 350
```

```
Thr Gly Ile Gly Thr Asn Thr Ala Ser Lys Thr Val Leu Ile Asp Tyr
        355                 360                 365

Glu Lys Tyr Gly Gln Phe His Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile Asp
    370                 375                 380

Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val Asn
385                 390                 395                 400

Pro Ser Gly Asp Asn Val Val Leu Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu Ile
                405                 410                 415

Pro Lys Ser Asn Ser Asn Ala Leu Ile Asp Ala Asn Asn Thr Asn Ile
            420                 425                 430

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

Val Asn Pro Ser Asp Phe Glu Asp Val Thr Asn Gln Val Arg Ile Ser
    450                 455                 460

Phe Pro Asn Ala Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Pro Thr Asp Asp Asp
465                 470                 475                 480

Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp Pro
                485                 490                 495

Ala Ser Thr Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Phe Tyr Gly Tyr Asp
            500                 505                 510

Ser Asn Phe Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala Phe
        515                 520                 525

Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val Pro
    530                 535                 540

Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
545                 550                 555
```

<210> 99
<211> 1674
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 99

atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60

gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120

gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180

agcgttagtg ctgcacctaa aacagacgac acaaacgtga gtgatactaa aacatcgtca 240

aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacaaga aacgacacaa 300

tcagcattaa caaatgcaac tacggaagaa actccggtaa ctggtgaagc tactacggca 360

acgaatcaag ctaatacacc ggcaacaact caatcaagca atacaaatgc ggaggaatta 420

gtgaatcaaa caagtaatga aacgacttct aatgatacta atacagtatc atctgtaaat 480

tcacctcaaa attctacaaa tgcggaaaat gtttcaacaa cgcaagatac ttcaactgaa 540

gcaacacctt caaacaatga atcagctcca cagaatacag atgcaagtaa taaagatgta 600

gttaatcaag cggttaatac aagtgcgcct agaaagagag catttagttt agcggctgta 660

gctgcagatg caccggcagc tggcacagat attacgaatc agttgacaga tgtgaaagtt 720

actattgact ctggtacgac tgtgtatccg caccaagcag gttatgtcaa actgaattat 780

ggtttttcag tgcctaattc tgctgttaaa ggtgacacat tcaaaataac tgtacctaaa 840

gaattaaact taaatggtgt aacttcaact gctaaagcgc caccaattat ggctggagat 900

caagtattgg caaatggtgt aatcgatagt gatggtaatg ttatttatac atttacagac 960

tatgttgata ataaagaaaa tgtaacagct aatattacta tgccagctta tattgaccct 1020

gaaaatgtta caaagacagg taatgtgaca ttgacaactg gcataggaac caatactgct 1080

agtaagacag tattaatcga ctatgagaaa tatggacaat tccataattt atcaattaaa 1140

ggtacgattg atcaaatcga taaaacaaat aatacgtatc gccaaacaat ttatgtcaat 1200

ccaagcggag ataacgttgt gttacctgcc ttaacaggta atttaattcc taatacaaag 1260

agtaatgcgt taatagatgc aaaaaacact gatattaaag tttatagagt cgataatgct 1320

aatgatttat ctgaaagtta ttatgtgaat cctagcgatt ttgaagatgt aactaatcaa 1380

gttagaattt catttccaaa tgctaatcaa tacaaagtag aatttcctac ggacgatgac 1440

caaattacaa caccgtatat tgtagttgtt aatggccata ttgatcctgc tagtacaggt 1500

gatttagcac tacgttcgac attttatggt tatgattcta attttatatg gagatctatg 1560

tcatgggaca acgaagtagc atttaataac ggatcaggtt ctggtgacgg tatcgataaa 1620

ccagttgttc ctgaacaacc tgatgagcct ggtgaaattg aaccaattcc agag 1674

<210> 100
<211> 558
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 100

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

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

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

  Ser Ala Ser Asn Glu Ser Lys Ser Asn Asp Ser Ser Ser Val Ser Ala
     50                  55                  60

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

  Asn Thr Asn Asn Gly Glu Thr Ser Val Ala Gln Asn Pro Ala Gln Gln
                 85                  90                  95

  Glu Thr Thr Gln Ser Ala Leu Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro
             100                 105                 110

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

  Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln Thr
     130                 135                 140

  Ser Asn Glu Thr Thr Ser Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val Asn
 145                 150                 155                 160

  Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln Asp
                 165                 170                 175

  Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln Asn
             180                 185                 190

  Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr Ser
         195                 200                 205

  Ala Pro Arg Lys Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp Ala
     210                 215                 220

  Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asp Val Lys Val
 225                 230                 235                 240

  Thr Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr Val
                 245                 250                 255

  Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly Asp
             260                 265                 270
```

```
Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val Thr
        275                 280                 285

Ser Thr Ala Lys Ala Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu Ala
    290                 295                 300

Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr Asp
305                 310                 315                 320

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

Tyr Ile Asp Pro Glu Asn Val Thr Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu Thr
            340                 345                 350

Thr Gly Ile Gly Thr Asn Thr Ala Ser Lys Thr Val Leu Ile Asp Tyr
        355                 360                 365

Glu Lys Tyr Gly Gln Phe His Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile Asp
    370                 375                 380

Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val Asn
385                 390                 395                 400

Pro Ser Gly Asp Asn Val Val Leu Pro Ala Leu Thr Gly Asn Leu Ile
                405                 410                 415

Pro Asn Thr Lys Ser Asn Ala Leu Ile Asp Ala Lys Asn Thr Asp Ile
            420                 425                 430

Lys Val Tyr Arg Val Asp Asn Ala Asn Asp Leu Ser Glu Ser Tyr Tyr
        435                 440                 445

Val Asn Pro Ser Asp Phe Glu Asp Val Thr Asn Gln Val Arg Ile Ser
    450                 455                 460

Phe Pro Asn Ala Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Pro Thr Asp Asp Asp
465                 470                 475                 480

Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp Pro
                485                 490                 495

Ala Ser Thr Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Phe Tyr Gly Tyr Asp
            500                 505                 510

Ser Asn Phe Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala Phe
```

515 520 525

Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val Pro
530 535 540

Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
545 550 555

<210> 101
<211> 1677
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 101

atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60

gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120

gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180

agcgttagtg ctgcacctaa aacagacgac acaaacgtga gtgatactaa aacatcgtca 240

aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300

tcatcatcaa caaatgcaac tacggaagaa acgccggtaa ctggtgaagc tactactacg 360

acaacgaatc aagctaatac accggcaaca actcaatcaa gcaatacaaa tgcggaggaa 420

ttagtgaatc aaacaagtaa tgaaacgact tctaatgata ctaatacagt atcatctgta 480

aattcacctc aaaattctac aaatgcggaa aatgtttcaa caacgcaaga tacttcaact 540

gaagcaacac cttcaaacaa tgaatcagct ccacagagta cagatgcaag taataaagat 600

gtagttaatc aagcggttaa tacaagtgcg cctagaatga gagcatttag tttagcggca 660

gtagctgcag atgcaccggc agctggcaca gatattacga atcagttgac gaatgtgaca 720

gttggtattg actctggaga tacagtttat ccgcaccaag caggctatgt caaactgaat 780

tatggttttt cagtgcctaa ttctgctgtt aaaggtgaca cattcaaaat aactgtacct 840

aaagaattaa acttaaatgg tgtaacttca actgctaaag tgccaccaat tatggctgga 900

gatcaagtat tggcaaatgg tgtaatcgat agtgatggta atgttattta tacatttaca 960

gactatgtaa atactaaaga tgatgttaaa gcaactttga ccatgcccgc ttatattgac 1020

cctgaaaatg ttacaaagac aggtaatgtg acattggcta ctggcatagg aaatacaaca 1080

gcaaacaaaa cagtattagt agattatgaa aaatatggta agttttataa cttatctatt 1140

aaaggtacaa ttgaccaaat cgataaaaca aataatacgt atcgtcagac aatttatgtc 1200

aatccaagtg gagataacgt tattgcgccg gttttaacag gtaatttaaa accaaatacg 1260

gatagtaatg cattaataga tcagcaaaat acaagtatta aagtatataa agtagataat 1320

gcagctgatt tatctgaaag ttactttgtg aatccagaaa actttgagga tgtcactaat 1380

agtgtgaata ttacattccc aaatccaaat caatataaag tagagtttaa tacgcctgat 1440

gatcaaatta caacaccgta tatagtagtt gttaatggtc atattgatcc gaatagcaaa 1500

ggtgatttag ctttacgttc aactttatat gggtatgact caaggtttgt atggagatct 1560

atgtcatggg acaacgaagt agcatttaat aacggatcag gttctggtga cggtatcgat 1620

aaaccagttg ttcctgaaca acctgatgag cctggtgaaa ttgaaccaat tccagag 1677

<210> 102
<211> 559
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 102

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

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

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

Ser Ala Ser Asn Glu Ser Lys Ser Asn Asp Ser Ser Ser Val Ser Ala
    50                  55                  60

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

Asn Thr Asn Asn Gly Glu Thr Ser Val Ala Gln Asn Pro Ala Gln Gln
                85                  90                  95

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

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

Ala Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln
    130                 135                 140

Thr Ser Asn Glu Thr Thr Ser Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val
145                 150                 155                 160

Asn Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln
                165                 170                 175

Asp Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln
```

```
            180                 185                 190

Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr
        195                 200                 205

Ser Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp
    210                 215                 220

Ala Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asn Val Thr
225                 230                 235                 240

Val Gly Ile Asp Ser Gly Asp Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr
                245                 250                 255

Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly
            260                 265                 270

Asp Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val
        275                 280                 285

Thr Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu
    290                 295                 300

Ala Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr
305                 310                 315                 320

Asp Tyr Val Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Met Pro
                325                 330                 335

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

Ala Thr Gly Ile Gly Asn Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp
        355                 360                 365

Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile
    370                 375                 380

Asp Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val
385                 390                 395                 400

Asn Pro Ser Gly Asp Asn Val Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu
                405                 410                 415

Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser
            420                 425                 430
```

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

Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile
    450                 455                 460

Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro Asp
465                 470                 475                 480

Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Asn Gly His Ile Asp
                485                 490                 495

Pro Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr
            500                 505                 510

Asp Ser Arg Phe Val Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala
        515                 520                 525

Phe Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val
    530                 535                 540

Pro Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
545                 550                 555
```

<210> 103
<211> 1677
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 103

atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60

gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120

gaaaatagtg ttacgcaatc cgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180

agcgttagtg ctgcacctaa aacagtcgac acaaacgtga gtgatactaa aacaacgtca 240

aacactaata gtggcgaaac aagtgtggcg caaaatccgg cacaacagga aacgacacaa 300

tcagcatcaa caaatgcaac tacggaagaa actccggcaa ctggtgaagc tactactacg 360

gcaacgaatc aagctaatac accggcaaca actcaatcaa gcaatacaaa tgcggaggaa 420

ttagtgaatc aaacaaataa tgaaacgact tctaatgata ctaatacagt atcatctgta 480

aattcacctc aaaattctac aaatgcggaa aatgtttcaa caacgcaaga tacttcaact 540

gaagcaacac cttcaaacaa tgaatcagct ccacagagta cagatgcaag taataaagat 600

gtagttaatc aagcggttaa tacaagtgcg cctagaatga gagcatttag tttagcggca 660

gtagctgcag atgcaccggc tgctggcaca gatattacga atcagttgac agatgtgaaa 720

gttactattg actctggtac gactgtgtat ccgcaccaag caggttatgt caaactgaat 780

tatggttttt cagtccctaa ttctgctgtt aaaggtgaca cattcaaaat aactgtacct 840

aaagaattaa acttaaatgg tgtaacttca actgctaagg tgccaccaat tatggccgga 900

gatcaagtat tggcaaatgg tgtaatcgat agtgatggta atgttattta tacatttaca 960

gactatgttg ataataaaga aaatgtaaca gctaatatta ctatgccagc ttatattgac 1020

cctgaaaatg ttacaaagac aggtaatgtg acattgacaa ctggcatagg aaccaatact 1080

gctagtaaga cagtattaat cgactatgag aaatatggac aattccataa tttatcaatt 1140

aaaggtacga ttgatcaaat cgataaaaca aataatacgt atcgccaaac aatttatgtc 1200

aatccaagcg gagataacgt tgtgttacct gccttaacag gtaatttaat tcctaataca 1260

aagagtaatg cgttaataga tgcaaaaaac actgatatta aagtttatag agtcgataat 1320

gctaatgatt tatctgaaag ttattatgtg aatcctagcg attttgaaga tgtaactaat 1380

caagttagaa tttcatttcc aaatgctaat caatacaaag tagaatttcc tacggacgat 1440

gaccaaatta caacaccgta tattgtagtt gttaatggcc atattgatcc tgctagtaca 1500

ggtgatttag cactacgttc gacattttat ggttatgatt ctaattttat atggagatct 1560

atgtcatggg acaacgaagt agcatttaat aacggatcag gctctggtga cggtatcgat 1620

aaaccagttg ttcctgaaca acctgatgag cctggtgaaa ttgaaccaat tccagag 1677

<210> 104
<211> 559
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 104

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

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

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

Ser Ala Ser Asn Glu Ser Lys Ser Asn Asp Ser Ser Ser Val Ser Ala
    50                  55                  60

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

Asn Thr Asn Ser Gly Glu Thr Ser Val Ala Gln Asn Pro Ala Gln Gln
                85                  90                  95
```

```
Glu Thr Thr Gln Ser Ala Ser Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro
            100                 105                 110

Ala Thr Gly Glu Ala Thr Thr Thr Ala Thr Asn Gln Ala Asn Thr Pro
        115                 120                 125

Ala Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln
    130                 135                 140

Thr Asn Asn Glu Thr Thr Ser Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val
145                 150                 155                 160

Asn Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln
                165                 170                 175

Asp Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln
            180                 185                 190

Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr
        195                 200                 205

Ser Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp
    210                 215                 220

Ala Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asp Val Lys
225                 230                 235                 240

Val Thr Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr
                245                 250                 255

Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly
            260                 265                 270

Asp Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val
        275                 280                 285

Thr Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu
    290                 295                 300

Ala Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr
305                 310                 315                 320

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

Ala Tyr Ile Asp Pro Glu Asn Val Thr Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu
            340                 345                 350
```

```
Thr Thr Gly Ile Gly Thr Asn Thr Ala Ser Lys Thr Val Leu Ile Asp
        355                 360                 365

Tyr Glu Lys Tyr Gly Gln Phe His Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile
    370                 375                 380

Asp Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val
385                 390                 395                 400

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

Ile Pro Asn Thr Lys Ser Asn Ala Leu Ile Asp Ala Lys Asn Thr Asp
            420                 425                 430

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

Tyr Val Asn Pro Ser Asp Phe Glu Asp Val Thr Asn Gln Val Arg Ile
    450                 455                 460

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

Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp
                485                 490                 495

Pro Ala Ser Thr Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Phe Tyr Gly Tyr
            500                 505                 510

Asp Ser Asn Phe Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala
        515                 520                 525

Phe Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val
    530                 535                 540

Pro Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
545                 550                 555
```

<210> 105
<211> 1677
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 105

atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60

gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120

gaaaatagtg ttacgcaatc cgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa taatccaagt 180

agcgttaacg ctgcacctaa aacagacaac acaaacgtga gtgatactaa aacaacgtca 240

aacactaata atagcgaaac gagtgtggca caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300

tcagcatcaa caaatgcaac tacggaagaa acaccggtaa ctggtgaagg tactactacg 360

gcaacgaatc aagctaatac accggcagca actcaatcaa acaatacaaa tgcggaggaa 420

ttagtgaatc aaacaagtaa tgaaacgact tctaatgata ctaatacagt atcatctgta 480

aattcacctc aaaattctac aaatgcggaa aatgtttcaa caacgcaaga cacttcaact 540

gaagcaacac cttcaaacaa tgaatcagct ccacagagta cagatgcaag taataaagat 600

gtagttagtc aagccgttaa tccaagtgcg cctagaatga gagcatttag tttagcggct 660

gtagctgcag atgcaccggc tgctggcaca gatattacga atcagttgac agatgttact 720

gttggtattg aatctggaga tacagtttat ccgcaccaag caggttatgt caaactgaat 780

tatggttttt ccgtgcctaa ttctgctgtt aaaggtgaca cattcaaaat aactgtacct 840

aaagaattaa acttaaatgg tgtaacttca actgctaaag ttcctccaat tatggctgga 900

gatcaagtat tagctaatgg tgtaatcgat agtgatggta atgttattta tacatttaca 960

gactatgtaa atactaaaga tgatgttaaa gcaacactaa ctgtgcctgc atacattgac 1020

cctgaatatg ttacacatac tggtaatgtg acattggcta ctggcatagg aaatacaaca 1080

gcaaacaaaa cagtattagt agattatgaa aaatatggta agttttataa cttatctatt 1140

aaaggtacaa ttgaccaagt cgataaaaca aataatacgt atcgtcagac aatttatgtc 1200

aatccaagtg gagataacgt tattgcaccg gttttaacag gtaatttaaa accaaatacg 1260

gatagtaatg cattaataga tcagcaaaat acaagtatta aagtatataa agtagataat 1320

gcagctgatt tatctgaaag ttactttgtg aatccagaaa actttgagga tgtcactaat 1380

agtgtaaata ttacattccc aaatccaaat caatataaag tagagtttaa tacgcctgat 1440

gatcaaatta caacaccgta tattgtagtt gttaatggtc atattgatcc gaatagcaaa 1500

ggtgatttag ctttacgttc aactttatat ggatataact caaatataat ttggcgctct 1560

atgtcatggg acaacgaagt agcatttaat aacggatcag gttctggtga cggtatcgat 1620

aaacctgttg ttcctgaaca acctgatgag ccgggtgaaa ttgaaccaat tccagag 1677

<210> 106
<211> 559
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 106

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

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

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

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

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

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

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

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

  Ala Ala Thr Gln Ser Asn Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln
     130                 135                 140

  Thr Ser Asn Glu Thr Thr Ser Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val
 145                 150                 155                 160

  Asn Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln
                 165                 170                 175

  Asp Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln
             180                 185                 190

  Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Ser Gln Ala Val Asn Pro
         195                 200                 205

  Ser Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp
     210                 215                 220

  Ala Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asp Val Thr
 225                 230                 235                 240

  Val Gly Ile Glu Ser Gly Asp Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr
                 245                 250                 255

  Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly
             260                 265                 270
```

```
Asp Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val
        275                 280                 285

Thr Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu
    290                 295                 300

Ala Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr
305                 310                 315                 320

Asp Tyr Val Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Val Pro
                325                 330                 335

Ala Tyr Ile Asp Pro Glu Tyr Val Thr His Thr Gly Asn Val Thr Leu
            340                 345                 350

Ala Thr Gly Ile Gly Asn Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp
        355                 360                 365

Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile
    370                 375                 380

Asp Gln Val Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val
385                 390                 395                 400

Asn Pro Ser Gly Asp Asn Val Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu
                405                 410                 415

Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser
            420                 425                 430

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

Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile
    450                 455                 460

Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro Asp
465                 470                 475                 480

Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp
                485                 490                 495

Pro Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr
            500                 505                 510

Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala
```

515 520 525

Phe Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val
530 535 540

Pro Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
545 550 555

<210> 107
<211> 1677
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 107

atgaatatga agaaacaaga aaaacacgca attcgtaaaa aatcgattgg cgtggcttca 60

gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt 120

gaaaatagta tgacacaaac ggaaaatacg agtaatgaga gcaaaagtaa tgatccaagt 180

agcgttaatg ctgcacctaa aacagacaac acaaacgtga gtgattctaa tacaacgaca 240

aacactaata gtgacgaaac gaatgtagcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300

tcagcatcaa caaatgcaac tacagaagaa acaccggtaa ctggtgaagt tactactacg 360

gcaacgaatc aagctaatac accggcaaca actcaatcaa gcaatacaaa tgcggaagaa 420

tcagtgaatc aaacaagtaa tgaaacgact tctaatgata ctaatacagt atcatctgta 480

aattcacctc aaaattctac aaatgcggaa aatgtttcaa caacgcaaga catttcaact 540

gaagcaacac cttcaaacaa tgaatcagct ccacagagta cagatgcaag taataaagat 600

gtagttaatc aagcggttaa tacaagtgcg cctagaatga gagcatttag tttagcggct 660

gtagctgcag atgcaccggc tgctggcaaa gatattacga atcagttgac gaatgtgaca 720

gttggtattg actctggaga tacagtttat ccgcaccaag caggctatgt caaactgaat 780

tatgggttct cagtaccaaa tgaggctgtt caaggtgaca cattcaaaat aactgtgccc 840

aaagaattaa acttaaatgg tgtaacttca actgctaaag tgccaccaat tatggccgga 900

gatcaagtat tggcaaatgg tgtaatcgat agtgatggta atgttattta tacatttaca 960

gactatgtaa atactaaaga tgatgttaaa gcaactttga ccatgcccgc ttatattgac 1020

cctgaaaatg ttacaaagac aggtaatgtg acattggcta ctggcatagg tagtacaaca 1080

gcaaacaaaa cagtattagt agattatgaa aaatatggta agttttataa cttatctatt 1140

aaaggtacaa ttgaccaaat cgataaaaca aataatacgt atcgtcagac aatttatgtc 1200

aatccaagtg gagataacgt tattgcgccg gttttaacag gtaatttaaa accaaatacg 1260

gatagtaatg cattaataga tgcacaaaat actagtatta aagtatataa agttgataat 1320

gcatcagact tgtctgaaag ttattatgtg aatccagata actttgaaga tgtcactgat 1380

agtgtgaata ttacattccc aaatccaaat caatataaag tagagttcaa tacgcctgat 1440

gatcaaataa caacaccata tattgtagtt gttaatgggc atattgatcc taatagtaaa 1500

ggtgatttag ctttacgttc aactttatat ggatataatt cgaatataat ttggcgatca 1560

atgtcatggg ataatgaagt agcatttaat aacggatcag gttttggtga cggtatcgat 1620

aaacctgttg ttcctgaaca acctgatgag ccgggtgaaa ttgaaccaat tccagag 1677

<210> 108
<211> 559
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 108

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

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

Ser Ser Lys Glu Ala Asp Ala Ser Glu Asn Ser Met Thr Gln Thr Glu
        35                  40                  45

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

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

Asn Thr Asn Ser Asp Glu Thr Asn Val Ala Gln Asn Pro Ala Gln Gln
                85                  90                  95

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

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

Ala Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Ser Val Asn Gln
    130                 135                 140

Thr Ser Asn Glu Thr Thr Ser Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val
145                 150                 155                 160

Asn Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln
                165                 170                 175

Asp Ile Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln
```

```
            180                 185                 190

Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr
        195                 200                 205

Ser Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp
    210                 215                 220

Ala Pro Ala Ala Gly Lys Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asn Val Thr
225                 230                 235                 240

Val Gly Ile Asp Ser Gly Asp Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr
                245                 250                 255

Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Glu Ala Val Gln Gly
            260                 265                 270

Asp Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val
        275                 280                 285

Thr Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu
    290                 295                 300

Ala Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr
305                 310                 315                 320

Asp Tyr Val Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Met Pro
                325                 330                 335

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

Ala Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp
        355                 360                 365

Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile
    370                 375                 380

Asp Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val
385                 390                 395                 400

Asn Pro Ser Gly Asp Asn Val Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu
                405                 410                 415

Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Ala Gln Asn Thr Ser
            420                 425                 430
```

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

Tyr Val Asn Pro Asp Asn Phe Glu Asp Val Thr Asp Ser Val Asn Ile
    450                 455                 460

Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro Asp
465                 470                 475                 480

Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp
                485                 490                 495

Pro Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr
            500                 505                 510

Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala
        515                 520                 525

Phe Asn Asn Gly Ser Gly Phe Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val
    530                 535                 540

Pro Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
545                 550                 555
```

<210> 109
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador Sintético

<400> 109
cacaaaattt acgaatagaa agaaacgag 29

<210> 110
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador Sintético

<400> 110
aaaatattgg agataccaat attttaggtt g 31

<210> 111
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador Sintético

<400> 111
tttcttggat ccggtactgg tggtaaacaa agcagtg 37

<210> 112

<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador Sintético

<400> 112
tttcttgcat gcttatttca tgcttccgtg tacagtttc 39

<210> 113
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador Sintético

<400> 113
tttcttccat gggtactggt ggtaaacaaa gcag 34

<210> 114
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador Sintético

<400> 114
tttcttgctc agcattattt catgcttccg tgtacag 37

<210> 115
<211> 309
<212> PRT
<213> *Staphylococcus epidermidis*

<400> 115

```
Val Lys Lys Ile Leu Ala Leu Ala Ile Ala Phe Leu Ile Ile Leu Ala
1               5                  10                  15

Ala Cys Gly Asn His Ser Asn His Glu His His Ser His Glu Gly Lys
            20                  25                  30

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

Val Gly Gly Asn Lys Val Asp Val His Ser Ile Val Pro Val Gly Gln
    50                  55                  60
```

```
Asp Pro His Glu Tyr Glu Val Lys Pro Lys Asp Ile Lys Ala Leu Thr
65                  70                  75                  80

Asp Ala Asp Val Val Phe Tyr Asn Gly Leu Asn Leu Glu Thr Gly Asn
                85                  90                  95

Gly Trp Phe Glu Lys Ala Leu Asp Gln Ala Gly Lys Ser Thr Lys Asp
            100                 105                 110

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

Gly Glu Glu Gly Asn Lys Asn Lys Gln Asp Pro His Ala Trp Leu Ser
    130                 135                 140

Leu Glu Asn Gly Ile Lys Tyr Val Lys Thr Ile Gln Lys Ser Leu Glu
145                 150                 155                 160

His His Asp Lys Lys Asp Lys Ser Thr Tyr Glu Lys Gln Gly Asn Ala
                165                 170                 175

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

Asp Asp Ile Pro Lys Asn Gln Arg Ala Met Met Thr Ser Glu Gly Ala
        195                 200                 205

Phe Lys Tyr Phe Ala Gln Gln Phe Asp Val Lys Pro Gly Tyr Ile Trp
    210                 215                 220

Glu Ile Asn Thr Glu Lys Gln Gly Thr Pro Gly Gln Met Lys Gln Ala
225                 230                 235                 240

Ile Lys Phe Val Lys Asp Asn His Leu Lys His Leu Leu Val Glu Thr
                245                 250                 255

Ser Val Asp Lys Lys Ala Met Gln Ser Leu Ser Glu Glu Thr Lys Lys
            260                 265                 270

Asp Ile Tyr Gly Glu Val Phe Thr Asp Ser Ile Gly Lys Ala Gly Thr
        275                 280                 285

Lys Gly Asp Ser Tyr Tyr Lys Met Met Lys Ser Asn Ile Asp Thr Ile
    290                 295                 300

His Gly Ser Met Lys
305
```

<210> 116

<211> 930
<212> ADN
<213> *Staphylococcus epidermidis*

<400> 116

```
gtgaaaaaaa ttctcgcttt agcaatagca tttttaatta tccttgccgc atgtgggaat       60

cacagtaacc atgaacatca ctcacatgaa ggaaaattaa aagttgtaac tacaaactct      120

attctctatg acatggttaa acgtgtcggt ggaaataagg tcgatgttca tagcatcgtt      180

ccagtaggac aagatccaca tgaatatgag gttaaaccta aagatattaa agcattaaca      240

gatgctgacg ttgtatttta taatggttta aacctagaaa ctggaaatgg ttggtttgaa      300

aaagcacttg accaagcagg aaaatcaaca aaagataaaa atgtgatagc agcatcaaat      360

aatgttaaac caatatactt aaatggtgag gaaggtaaca aaaacaaaca agatccacat      420

gcatggttaa gtttagagaa tggaattaaa tacgtaaaaa caatacaaaa atcactagaa      480

catcatgata aaaaagataa gtctacatat gaaaaacaag ggaatgcata tatatcaaaa      540

ttagaagaac ttaataaaga tagtaaaaat aaatttgatg acatacccaa aaatcaacgt      600

gccatgatga caagtgaagg tgcatttaaa tattttgctc aacaattcga tgttaaacca      660

ggttatattt gggagataaa cacagaaaaa caaggtacac ctggtcaaat gaaacaagcc      720

attaaatttg ttaaagataa tcatttaaaa catttattag tcgaaacaag cgtagataaa      780

aaagctatgc aaagtttatc agaagaaact aagaaagata tttatggtga agtatttacc      840

gactctatag gtaaggcagg tactaaaggt gactcatact ataaaatgat gaaatctaat      900

attgatacaa tacatggtag tatgaaataa                                       930
```

<210> 117
<211> 510
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 117

```
Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Ala Ser Glu Gln Ser
1               5                  10                  15

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

Lys Asn Asn Met Ile Glu Thr Pro Gln Leu Asn Thr Thr Ala Asn Asp
        35                  40                  45

Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn Val Asp Ser Thr
    50                  55                  60
```

```
Thr Lys Pro Met Ser Thr Gln Thr Ser Asn Thr Thr Thr Thr Glu Pro
65                  70                  75                  80

Ala Ser Thr Asn Glu Thr Pro Gln Pro Thr Ala Ile Lys Asn Gln Ala
                85                  90                  95

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

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

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

Gln Thr Ile Ser Asn Ala Gln Gly Thr Ser Lys Pro Ser Val Arg Thr
145                 150                 155                 160

Arg Ala Val Arg Ser Leu Ala Val Ala Glu Pro Val Val Asn Ala Ala
                165                 170                 175

Asp Ala Lys Gly Thr Asn Val Asn Asp Lys Val Thr Ala Ser Asn Phe
            180                 185                 190

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

Met Ala Ala Asn Phe Thr Val Thr Asp Lys Val Lys Ser Gly Asp Tyr
    210                 215                 220

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

Tyr Ser Asn Ser Asn Asn Thr Met Pro Ile Ala Asp Ile Lys Ser Thr
                245                 250                 255

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

Tyr Thr Phe Val Phe Thr Asp Tyr Val Asn Asn Lys Glu Asn Ile Asn
        275                 280                 285

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

Ser Gly Thr Tyr Asp Ala Asn Ile Asn Ile Ala Asp Glu Met Phe Asn
305                 310                 315                 320
```

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

Pro Asn Gly Ala Asn Ile Ser Ser Gln Ile Ile Gly Val Asp Thr Ala
            340                 345                 350

Ser Gly Gln Asn Thr Tyr Lys Gln Thr Val Phe Val Asn Pro Lys Gln
        355                 360                 365

Arg Val Leu Gly Asn Thr Trp Val Tyr Ile Lys Gly Tyr Gln Asp Lys
    370                 375                 380

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

Ile Phe Glu Val Asn Asp Thr Ser Lys Leu Ser Asp Ser Tyr Tyr Ala
                405                 410                 415

Asp Pro Asn Asp Ser Asn Leu Lys Glu Val Thr Asp Gln Phe Lys Asn
            420                 425                 430

Arg Ile Tyr Tyr Glu His Pro Asn Val Ala Ser Ile Lys Phe Gly Asp
        435                 440                 445

Ile Thr Lys Thr Tyr Val Val Leu Val Glu Gly His Tyr Asp Asn Thr
    450                 455                 460

Gly Lys Asn Leu Lys Thr Gln Val Ile Gln Glu Asn Val Asp Pro Val
465                 470                 475                 480

Thr Asn Arg Asp Tyr Ser Ile Phe Gly Trp Asn Asn Glu Asn Val Val
                485                 490                 495

Arg Tyr Gly Gly Gly Ser Ala Asp Gly Asp Ser Ala Val Asn
            500                 505                 510
```

<210> 118
<211> 1533
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 118

```
atggctagca tgactggtgg acagcaaatg ggtgcttcag aacaatcgaa cgatacaacg      60

caatcttcga aaaataatgc aagtgcagat tccgaaaaaa acaatatgat agaaacacct     120

caattaaata caacggctaa tgatacatct gatattagtg caaacacaaa cagtgcgaat     180

gtagatagca caacaaaacc aatgtctaca caaacgagca ataccactac aacagagcca     240
```

gcttcaacaa atgaaacacc tcaaccgacg gcaattaaaa atcaagcaac tgctgcaaaa 300

atgcaagatc aaactgttcc tcaagaagca aattctcaag tagataataa aacaacgaat 360

gatgctaata gcatagcaac aaacagtgag cttaaaaatt ctcaaacatt agatttacca 420

caatcatcac cacaaacgat ttccaatgcg caaggaacta gtaaaccaag tgttagaacg 480

agagctgtac gtagtttagc tgttgctgaa ccggtagtaa atgctgctga tgctaaaggt 540

acaaatgtaa atgataaagt tacggcaagt aatttcaagt tagaaaagac tacatttgac 600

cctaatcaaa gtggtaacac atttatggcg gcaaatttta cagtgacaga taaagtgaaa 660

tcaggggatt attttacagc gaagttacca gatagtttaa ctggtaatgg agacgtggat 720

tattctaatt caaataatac gatgccaatt gcagacatta aaagtacgaa tggcgatgtt 780

gtagctaaag caacatatga tatcttgact aagacgtata catttgtctt tacagattat 840

gtaaataata aagaaaatat taacggacaa ttttcattac ctttatttac agaccgagca 900

aaggcaccta aatcaggaac atatgatgcg aatattaata ttgcggatga aatgtttaat 960

aataaaatta cttataacta tagttcgcca attgcaggaa ttgataaacc aaatggcgcg 1020

aacatttctt ctcaaattat tggtgtagat acagcttcag gtcaaaacac atacaagcaa 1080

acagtatttg ttaaccctaa gcaacgagtt ttaggtaata cgtgggtgta tattaaaggc 1140

taccaagata aaatcgaaga aagtagcggt aaagtaagtg ctacagatac aaaactgaga 1200

atttttgaag tgaatgatac atctaaatta tcagatagct actatgcaga tccaaatgac 1260

tctaacctta aagaagtaac agaccaattt aaaaatagaa tctattatga gcatccaaat 1320

gtagctagta ttaaatttgg tgatattact aaaacatatg tagtattagt agaagggcat 1380

tacgacaata caggtaagaa cttaaaaact caggttattc aagaaaatgt tgatcctgta 1440

acaaatagag actacagtat tttcggttgg aataatgaga atgttgtacg ttatggtggt 1500

ggaagtgctg atggtgattc agcagtaaat taa 1533

<210> 119
<211> 292
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 119

Met Gly Thr Gly Gly Lys Gln Ser Ser Asp Lys Ser Asn Gly Lys Leu
1 5 10 15

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

Gly Gly Asp Asn Val Asp Ile His Ser Ile Val Pro Val Gly Gln Asp
35 40 45

```
Pro His Glu Tyr Glu Val Lys Pro Lys Asp Ile Lys Lys Leu Thr Asp
    50                  55                  60

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

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

Lys Val Ile Ala Val Ser Lys Asp Val Lys Pro Ile Tyr Leu Asn Gly
            100                 105                 110

Glu Glu Gly Asn Lys Asp Lys Gln Asp Pro His Ala Trp Leu Ser Leu
        115                 120                 125

Asp Asn Gly Ile Lys Tyr Val Lys Thr Ile Gln Gln Thr Phe Ile Asp
    130                 135                 140

Asn Asp Lys Lys His Lys Ala Asp Tyr Glu Lys Gln Gly Asn Lys Tyr
145                 150                 155                 160

Ile Ala Gln Leu Glu Lys Leu Asn Asn Asp Ser Lys Asp Lys Phe Asn
                165                 170                 175

Asp Ile Pro Lys Glu Gln Arg Ala Met Ile Thr Ser Glu Gly Ala Phe
            180                 185                 190

Lys Tyr Phe Ser Lys Gln Tyr Gly Ile Thr Pro Gly Tyr Ile Trp Glu
        195                 200                 205

Ile Asn Thr Glu Lys Gln Gly Thr Pro Glu Gln Met Arg Gln Ala Ile
    210                 215                 220

Glu Phe Val Lys Lys His Lys Leu Lys His Leu Leu Val Glu Thr Ser
225                 230                 235                 240

Val Asp Lys Lys Ala Met Glu Ser Leu Ser Glu Glu Thr Lys Lys Asp
                245                 250                 255

Ile Phe Gly Glu Val Tyr Thr Asp Ser Ile Gly Lys Glu Gly Thr Lys
            260                 265                 270

Gly Asp Ser Tyr Tyr Lys Met Met Lys Ser Asn Ile Glu Thr Val His
        275                 280                 285

Gly Ser Met Lys

    290
```

<210> 120
<211> 879
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 120

atgggtactg gtggtaaaca aagcagtgat aagtcaaatg gcaaattaaa agtagtaacg 60

acgaattcaa ttttatatga tatggctaaa aatgttggtg gagacaacgt cgatattcat 120

agtattgtac ctgttggtca agatcctcat gaatatgaag ttaaacctaa agatattaaa 180

aagttaactg acgctgacgt tattttatac aacggattaa atttagagac tggtaacggt 240

tggtttgaaa aagccttaga acaggctggt aaatcattaa aagataaaaa agttatcgca 300

gtatcaaaag atgttaaacc tatctattta aacggtgaag aaggcaacaa agataaacaa 360

gatccacacg catggttaag tttagataat ggtattaaat acgtaaaaac aattcaacaa 420

acatttatcg ataacgacaa aaaacataaa gcagattatg aaaagcaagg taacaaatac 480

attgctcaat tggaaaaatt aaataatgac agtaaagaca aatttaatga cattccaaaa 540

gaacaacgtg ccatgattac aagtgaaggt gccttcaagt acttctcaaa acaatacggt 600

attacaccag gttatatttg ggaaattaac actgaaaaac aaggtacacc tgaacaaatg 660

agacaagcta ttgagtttgt taaaaagcac aaattaaaac acttattagt agaaacaagt 720

gttgataaga aagcaatgga aagtttatct gaagaaacga agaaagatat ctttggtgaa 780

gtgtacacag attcaatcgg taaagaaggc actaaaggtg actcttacta caaaatgatg 840

aaatcaaata ttgaaactgt acacggaagc atgaaataa 879

<210> 121
<211> 292
<212> PRT
<213> *Staphylococcus epidermidis*

<400> 121

Met Gly Asn His Ser Asn His Glu His His Ser His Glu Gly Lys Leu
1 5 10 15

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

Gly Gly Asn Lys Val Asp Val His Ser Ile Val Pro Val Gly Gln Asp
35 40 45

Pro His Glu Tyr Glu Val Lys Pro Lys Asp Ile Lys Ala Leu Thr Asp
50 55 60

```
Ala Asp Val Val Phe Tyr Asn Gly Leu Asn Leu Glu Thr Gly Asn Gly
65                  70                  75                  80

Trp Phe Glu Lys Ala Leu Asp Gln Ala Gly Lys Ser Thr Lys Asp Lys
                85                  90                  95

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

Glu Glu Gly Asn Lys Asn Lys Gln Asp Pro His Ala Trp Leu Ser Leu
        115                 120                 125

Glu Asn Gly Ile Lys Tyr Val Lys Thr Ile Gln Lys Ser Leu Glu His
    130                 135                 140

His Asp Lys Lys Asp Lys Ser Thr Tyr Glu Lys Gln Gly Asn Ala Tyr
145                 150                 155                 160

Ile Ser Lys Leu Glu Glu Leu Asn Lys Asp Ser Lys Asn Lys Phe Asp
                165                 170                 175

Asp Ile Pro Lys Asn Gln Arg Ala Met Met Thr Ser Glu Gly Ala Phe
            180                 185                 190

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

Ile Asn Thr Glu Lys Gln Gly Thr Pro Gly Gln Met Lys Gln Ala Ile
    210                 215                 220

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

Val Asp Lys Lys Ala Met Gln Ser Leu Ser Glu Glu Thr Lys Lys Asp
                245                 250                 255

Ile Tyr Gly Glu Val Phe Thr Asp Ser Ile Gly Lys Glu Gly Thr Lys
            260                 265                 270

Gly Asp Ser Tyr Tyr Lys Met Met Lys Ser Asn Ile Asp Thr Ile His
        275                 280                 285

Gly Ser Met Lys
    290
```

<210> 122
<211> 879
<212> ADN

<213> *Staphylococcus epidermidis*

<400> 122

atggggaatc acagtaacca tgaacatcac tcacatgaag gaaaattaaa agttgtaact 60

acaaactcta ttctctatga catggttaaa cgtgtcggtg gaaataaggt cgatgttcat 120

agcatcgttc cagtaggaca agatccacat gaatatgagg ttaaacctaa agatattaaa 180

gcattaacag atgctgacgt tgtattttat aatggtttaa acctagaaac tggaaatggt 240

tggtttgaaa aagcacttga ccaagcagga aaatcaacaa aagataaaaa tgtgatagca 300

gcatcaaata atgttaaacc aatatactta aatggtgagg aaggtaacaa aaacaaacaa 360

gatccacatg catggttaag tttagagaat ggaattaaat acgtaaaaac aatacaaaaa 420

tcactagaac atcatgataa aaaagataag tctacatatg aaaaacaagg gaatgcatat 480

atatcaaaat tagaagaact taataaagat agtaaaaata aatttgatga catacccaaa 540

aatcaacgtg ccatgatgac aagtgaaggt gcatttaaat attttgctca acaattcgat 600

gttaaaccag gttatatttg ggagataaac acagaaaaac aaggtacacc tggtcaaatg 660

aaacaagcca ttaaatttgt taaagataat catttaaaac atttattagt cgaaacaagc 720

gtagataaaa aagctatgca aagtttatca gaagaaacta agaaagatat ttatggtgaa 780

gtatttaccg actctatagg taaggaaggt actaaaggtg actcatacta taaaatgatg 840

aaatctaata ttgatacaat acatggtagt atgaaataa 879

<210> 123
<211> 531
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 123

```
Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Ser Glu Asn Ser Val
1               5                  10                  15

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

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

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

Pro Ala Gln Gln Glu Thr Thr Gln Ser Ser Ser Thr Asn Ala Thr Thr
65                  70                  75                  80

Glu Glu Thr Pro Val Thr Gly Glu Ala Thr Thr Thr Thr Thr Asn Gln
                85                  90                  95
```

```
Ala Asn Thr Pro Ala Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu
            100                 105                 110

Leu Val Asn Gln Thr Ser Asn Glu Thr Thr Phe Asn Asp Thr Asn Thr
        115                 120                 125

Val Ser Ser Val Asn Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val
    130                 135                 140

Ser Thr Thr Gln Asp Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu
145                 150                 155                 160

Ser Ala Pro Gln Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln
                165                 170                 175

Ala Val Asn Thr Ser Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala
            180                 185                 190

Val Ala Ala Asp Ala Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu
        195                 200                 205

Thr Asn Val Thr Val Gly Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His
    210                 215                 220

Gln Ala Gly Tyr Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser
225                 230                 235                 240

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

Leu Asn Gly Val Thr Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly
            260                 265                 270

Asp Gln Val Leu Ala Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile
        275                 280                 285

Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Val Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr
    290                 295                 300

Leu Thr Met Pro Ala Ala Ile Asp Pro Glu Asn Val Lys Lys Thr Gly
305                 310                 315                 320

Asn Val Thr Leu Ala Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys Thr
                325                 330                 335

Val Leu Val Asp Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr Asn Leu Ser Ile
```

```
                340                 345                 350

Lys Gly Thr Ile Asp Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln
        355                 360                 365

Thr Ile Tyr Val Asn Pro Ser Gly Asp Asn Val Ile Ala Pro Val Leu
    370                 375                 380

Thr Gly Asn Leu Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln
385                 390                 395                 400

Gln Asn Thr Ser Ile Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp Leu
                405                 410                 415

Ser Glu Ser Tyr Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn
            420                 425                 430

Ser Val Asn Ile Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe
        435                 440                 445

Asn Thr Pro Asp Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn
    450                 455                 460

Gly His Ile Asp Pro Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr
465                 470                 475                 480

Leu Tyr Gly Tyr Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp
                485                 490                 495

Asn Glu Val Ala Phe Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp
            500                 505                 510

Lys Pro Val Val Pro Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro
        515                 520                 525

Ile Pro Glu
    530
```

<210> 124
<211> 1596
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 124

atggctagca tgactggtgg acagcaaatg ggtagtgaaa atagtgttac gcaatctgat 60

agcgcaagta acgaaagcaa aagtaatgat tcaagtagcg ttagtgctgc acctaaaaca 120

gacgacacaa acgtgagtga tactaaaaca tcgtcaaaca ctaataatgg cgaaacgagt 180

gtggcgcaaa atccagcaca acaggaaacg acacaatcat catcaacaaa tgcaactacg 240

gaagaaacgc cggtaactgg tgaagctact actacgacaa cgaatcaagc taatacaccg 300

gcaacaactc aatcaagcaa tacaaatgct gaagaattag tgaatcaaac aagtaatgaa 360

acgactttta atgatactaa tacagtatca tctgtaaatt cacctcaaaa ttctacaaat 420

gcggaaaatg tttcaacaac gcaagatact tcaactgaag caacaccttc aaacaatgaa 480

tcagctccac agagtacaga tgcaagtaat aaagatgtag ttaatcaagc ggttaataca 540

agtgcgccta gaatgagagc atttagttta gcggcagtag ctgcagatgc accggcagct 600

ggcacagata ttacgaatca gttgacgaat gtgacagttg gtattgactc tggtacgact 660

gtgtatccac accaagcagg ttatgtcaaa ctgaattatg gtttttcagt gcctaattct 720

gctgttaaag gtgacacatt caaaataact gtacctaaag aattaaactt aaatggtgta 780

acttcaactg ctaaagtgcc accaattatg gctggagatc aagtattggc aaatggtgta 840

atcgatagtg atggtaatgt tatttataca tttacagact atgtaaatac taaagatgat 900

gtaaaagcaa ctttgaccat gcccgctgct attgaccctg aaaatgttaa aaagacaggt 960

aatgtgacat tggctactgg cataggtagt acaacagcaa acaaaacagt attagtagat 1020

tatgaaaaat atggtaagtt ttataactta tctattaaag gtacaattga ccaaatcgat 1080

aaaacaaata atacgtatcg tcagacaatt tatgtcaatc caagtggaga taacgttatt 1140

gcgccggttt taacaggtaa tttaaaacca aatacggata gtaatgcatt aatagatcag 1200

caaaatacaa gtattaaagt atataaagta gataatgcag ctgatttatc tgaaagttac 1260

tttgtgaatc cagaaaactt tgaggatgtc actaatagtg tgaatattac attcccaaat 1320

ccaaatcaat ataaagtaga gtttaatacg cctgatgatc aaattacaac accgtatata 1380

gtagttgtta atggtcatat tgatccgaat agcaaaggtg atttagcttt acgttcaact 1440

ttatatgggt ataactcgaa tataatttgg cgctctatgt catgggacaa cgaagtagca 1500

tttaataacg gatcaggttc tggtgacggt atcgataaac cagttgttcc tgaacaacct 1560

gatgagcctg gtgaaattga accaattcca gagtag 1596

<210> 125
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido Sintético

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Cualquier aminoácido

<400> 125

Leu Pro Xaa Thr Gly
1 5

<210> 126
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido Sintético

<400> 126

Thr Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Val Asp
1 5

<210> 127
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido Sintético

<400> 127

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser
1 5 10

<210> 128
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido Sintético

<400> 128

Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Gly Ser
1 5 10

<210> 129
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido Sintético

<400> 129

Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly
1 5 10

<210> 130
<211> 933
<212> PRT

<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 130

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

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

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

Ser Ala Ser Asn Glu Ser Lys Ser Asn Asp Ser Ser Ser Val Ser Ala
    50                  55                  60

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

Asn Thr Asn Asn Gly Glu Thr Ser Val Ala Gln Asn Pro Ala Gln Gln
                85                  90                  95

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

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

Ala Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln
    130                 135                 140

Thr Ser Asn Glu Thr Thr Phe Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val
145                 150                 155                 160

Asn Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln
                165                 170                 175

Asp Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln
            180                 185                 190

Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr
        195                 200                 205

Ser Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp
    210                 215                 220

Ala Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asn Val Thr
```

225 230 235 240

Val Gly Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr
245 250 255

Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly
260 265 270

Asp Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val
275 280 285

Thr Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu
290 295 300

Ala Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr
305 310 315 320

Asp Tyr Val Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Met Pro
325 330 335

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

Ala Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp
355 360 365

Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile
370 375 380

Asp Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val
385 390 395 400

Asn Pro Ser Gly Asp Asn Val Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu
405 410 415

Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser
420 425 430

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

Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile
450 455 460

Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro Asp
465 470 475 480

```
Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp
                485                 490                 495

Pro Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr
            500                 505                 510

Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala
        515                 520                 525

Phe Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val
    530                 535                 540

Pro Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu Asp
545                 550                 555                 560

Ser Asp Ser Asp Pro Gly Ser Asp Ser Gly Ser Asp Ser Asn Ser Asp
                565                 570                 575

Ser Gly Ser Asp Ser Gly Ser Asp Ser Thr Ser Asp Ser Gly Ser Asp
            580                 585                 590

Ser Ala Ser Asp Ser Asp Ser Ala Ser Asp Ser Asp Ser Ala Ser Asp
        595                 600                 605

Ser Asp Ser Ala Ser Asp Ser Asp Ser Ala Ser Asp Ser Asp Ser Asp
    610                 615                 620

Asn Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp
625                 630                 635                 640

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Asp Ser Asp Ser Ala Ser Asp Ser Asp Ser Gly Ser Asp Ser Asp
        835                 840                 845

Ser Ser Ser Asp Ser Asp Ser Glu Ser Asp Ser Asn Ser Asp Ser Glu
    850                 855                 860

Ser Gly Ser Asn Asn Asn Val Val Pro Pro Asn Ser Pro Lys Asn Gly
865                 870                 875                 880

Thr Asn Ala Ser Asn Lys Asn Glu Ala Lys Asp Ser Lys Glu Pro Leu
                885                 890                 895

Pro Asp Thr Gly Ser Glu Asp Glu Ala Asn Thr Ser Leu Ile Trp Gly
            900                 905                 910

Leu Leu Ala Ser Ile Gly Ser Leu Leu Leu Phe Arg Arg Lys Lys Glu
        915                 920                 925

Asn Lys Asp Lys Lys
    930
```

<210> 131
<211> 2802
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 131

```
atgaatatga agaaaaaaga aaaacacgca attcggaaaa aatcgattgg cgtggcttca       60

gtgcttgtag gtacgttaat cggttttgga ctactcagca gtaaagaagc agatgcaagt      120
```

gaaaatagtg ttacgcaatc tgatagcgca agtaacgaaa gcaaaagtaa tgattcaagt 180

agcgttagtg ctgcacctaa aacagacgac acaaacgtga gtgatactaa aacatcgtca 240

aacactaata atggcgaaac gagtgtggcg caaaatccag cacaacagga aacgacacaa 300

tcatcatcaa caaatgcaac tacggaagaa acgccggtaa ctggtgaagc tactactacg 360

acaacgaatc aagctaatac accggcaaca actcaatcaa gcaatacaaa tgcggaggaa 420

ttagtgaatc aaacaagtaa tgaaacgact tttaatgata ctaatacagt atcatctgta 480

aattcacctc aaaattctac aaatgcggaa aatgtttcaa caacgcaaga tacttcaact 540

gaagcaacac cttcaaacaa tgaatcagct ccacagagta cagatgcaag taataaagat 600

gtagttaatc aagcggttaa tacaagtgcg cctagaatga gagcatttag tttagcggca 660

gtagctgcag atgcaccggc agctggcaca gatattacga atcagttgac gaatgtgaca 720

gttggtattg actctggtac gactgtgtat ccgcaccaag caggttatgt caaactgaat 780

tatggttttt cagtgcctaa ttctgctgtt aaaggtgaca cattcaaaat aactgtacct 840

aaagaattaa acttaaatgg tgtaacttca actgctaaag tgccaccaat tatggctgga 900

gatcaagtat tggcaaatgg tgtaatcgat agtgatggta atgttattta tacatttaca 960

gactatgtaa atactaaaga tgatgtaaaa gcaactttga ccatgcccgc ttatattgac 1020

cctgaaaatg ttaaaaagac aggtaatgtg acattggcta ctggcatagg tagtacaaca 1080

gcaaacaaaa cagtattagt agattatgaa aaatatggta agttttataa cttatctatt 1140

aaaggtacaa ttgaccaaat cgataaaaca aataatacgt atcgtcagac aatttatgtc 1200

aatccaagtg gagataacgt tattgcgccg gttttaacag gtaatttaaa accaaatacg 1260

gatagtaatg cattaataga tcagcaaaat acaagtatta aagtatataa agtagataat 1320

gcagctgatt tatctgaaag ttactttgtg aatccagaaa actttgagga tgtcactaat 1380

agtgtgaata ttacattccc aaatccaaat caatataaag tagagtttaa tacgcctgat 1440

gatcaaatta caacaccgta tatagtagtt gttaatggtc atattgatcc gaatagcaaa 1500

ggtgatttag ctttacgttc aactttatat gggtataact cgaatataat ttggcgctct 1560

atgtcatggg acaacgaagt agcatttaat aacggatcag gttctggtga cggtatcgat 1620

aaaccagttg ttcctgaaca acctgatgag cctggtgaaa ttgaaccaat tccagaggat 1680

tcagattctg acccaggttc agattctggc agcgattcta attcagatag cggttcagat 1740

tcgggtagtg attctacatc agatagtggt tcagattcag cgagtgattc agattcagca 1800

agtgattcag actcagcgag tgattcagat tcagcaagcg attccgactc agcgagcgat 1860

tccgactcag acaatgactc ggattcagat agcgattctg actcagacag tgactcagat 1920

tccgacagtg actcagattc agatagcgat tctgactcag acagtgactc agattcagat 1980

agcgattcag attcagatag cgattcagat tccgacagtg attccgactc agacagcgat 2040

tctgactccg acagtgattc cgactcagac agcgattcag attccgacag tgattccgac 2100

tcagatagcg attccgactc agatagcgac tcagattcag acagcgattc agattcagac 2160

agcgattcag attcagatag cgattcagat tccgacagtg actcagattc cgacagtgac 2220

tcggattcag atagcgattc agattccgac agtgactcag attccgacag tgactcagac 2280

tcagacagtg attcggattc agcgagtgat tcggattcag atagtgattc cgactccgac 2340

agtgactcgg attcagatag cgactcagac tcggatagcg actcggattc agatagcgat 2400

tcggactcag atagcgattc agaatcagac agcgattcag aatcagacag cgattcagat 2460

tcagacagcg actcagacag tgactcagat tcagatagtg actcggattc agcgagtgat 2520

tcagactcag gtagtgactc cgattcatca agtgattccg actcagaaag tgattcaaat 2580

agcgattccg agtcaggttc taacaataat gtagttccgc ctaattcacc taaaaatggt 2640

actaatgctt ctaataaaaa tgaggctaaa gatagtaaag aaccattacc agatacaggt 2700

tctgaagatg aagcaaatac gtcactaatt tggggattat tagcatcaat aggttcatta 2760

ctacttttca gaagaaaaaa agaaaataaa gataagaaat aa 2802

<210> 132
<211> 309
<212> PRT
<213> *Staphylococcus epidermidis*

<400> 132

Met Lys Lys Ile Leu Ala Leu Ala Ile Ala Phe Leu Ile Ile Leu Ala
1 5 10 15

Ala Cys Gly Asn His Ser Asn His Glu His His Ser His Glu Gly Lys
20 25 30

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

Val Gly Gly Asn Lys Val Asp Val His Ser Ile Val Pro Val Gly Gln
50 55 60

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

Asp Ala Asp Val Val Phe Tyr Asn Gly Leu Asn Leu Glu Thr Gly Asn
85 90 95

Gly Trp Phe Glu Lys Ala Leu Asp Gln Ala Gly Lys Ser Thr Lys Asp
100 105 110

```
Lys Asn Val Ile Ala Ala Ser Asn Asn Val Lys Pro Ile Tyr Leu Asn
        115                 120                 125

Gly Glu Glu Gly Asn Lys Asn Lys Gln Asp Pro His Ala Trp Leu Ser
    130                 135                 140

Leu Glu Asn Gly Ile Lys Tyr Val Lys Thr Ile Gln Lys Ser Leu Glu
145                 150                 155                 160

His His Asp Lys Lys Asp Lys Ser Thr Tyr Glu Lys Gln Gly Asn Ala
                165                 170                 175

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

Asp Asp Ile Pro Lys Asn Gln Arg Ala Met Met Thr Ser Glu Gly Ala
        195                 200                 205

Phe Lys Tyr Phe Ala Gln Gln Phe Asp Val Lys Pro Gly Tyr Ile Trp
    210                 215                 220

Glu Ile Asn Thr Glu Lys Gln Gly Thr Pro Gly Gln Met Lys Gln Ala
225                 230                 235                 240

Ile Lys Phe Val Lys Asp Asn His Leu Lys His Leu Leu Val Glu Thr
                245                 250                 255

Ser Val Asp Lys Lys Ala Met Gln Ser Leu Ser Glu Glu Thr Lys Lys
            260                 265                 270

Asp Ile Tyr Gly Glu Val Phe Thr Asp Ser Ile Gly Lys Glu Gly Thr
        275                 280                 285

Lys Gly Asp Ser Tyr Tyr Lys Met Met Lys Ser Asn Ile Asp Thr Ile
    290                 295                 300

His Gly Ser Met Lys
305
```

<210> 133
<211> 930
<212> ADN
<213> *Staphylococcus epidermidis*

<400> 133

gtgaaaaaaa ttctcgcttt agcaatagca tttttaatta tccttgccgc atgtgggaat 60

cacagtaacc atgaacatca ctcacatgaa ggaaaattaa aagttgtaac tacaaactct 120

attctctatg acatggttaa acgtgtcggt ggaaataagg tcgatgttca tagcatcgtt 180

ccagtaggac aagatccaca tgaatatgag gttaaaccta aagatattaa agcattaaca 240

gatgctgacg ttgtatttta taatggttta aacctagaaa ctggaaatgg ttggtttgaa 300

aaagcacttg accaagcagg aaaatcaaca aaagataaaa atgtgatagc agcatcaaat 360

aatgttaaac caatatactt aaatggtgag gaaggtaaca aaaacaaaca agatccacat 420

gcatggttaa gtttagagaa tggaattaaa tacgtaaaaa caatacaaaa atcactagaa 480

catcatgata aaaaagataa gtctacatat gaaaaacaag ggaatgcata tatatcaaaa 540

ttagaagaac ttaataaaga tagtaaaaat aaatttgatg acatacccaa aaatcaacgt 600

gccatgatga caagtgaagg tgcatttaaa tattttgctc aacaattcga tgttaaacca 660

ggttatattt gggagataaa cacagaaaaa caaggtacac ctggtcaaat gaaacaagcc 720

attaaatttg ttaaagataa tcatttaaaa catttattag tcgaaacaag cgtagataaa 780

aaagctatgc aaagtttatc agaagaaact aagaaagata tttatggtga agtatttacc 840

gactctatag gtaaggaagg tactaaaggt gactcatact ataaaatgat gaaatctaat 900

attgatacaa tacatggtag tatgaaataa 930

<210> 134
<211> 309
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 134

```
Met Lys Lys Leu Val Pro Leu Leu Leu Ala Leu Leu Leu Leu Val Ala
1               5                  10                  15

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

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

Val Gly Gly Asp Asn Val Asp Ile His Ser Ile Val Pro Val Gly Gln
    50                  55                  60

Asp Pro His Glu Tyr Glu Val Lys Pro Lys Asp Ile Lys Lys Leu Thr
65                  70                  75                  80

Asp Ala Asp Val Ile Leu Tyr Asn Gly Leu Asn Leu Glu Thr Gly Asn
                85                  90                  95

Gly Trp Phe Glu Lys Ala Leu Glu Gln Ala Gly Lys Ser Leu Lys Asp
            100                 105                 110
```

```
Lys Lys Val Ile Ala Val Ser Lys Asp Val Lys Pro Ile Tyr Leu Asn
        115                 120                 125

Gly Glu Glu Gly Asn Lys Asp Lys Gln Asp Pro His Ala Trp Leu Ser
    130                 135                 140

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

Asp Asn Asp Lys Lys His Lys Ala Asp Tyr Glu Lys Gln Gly Asn Lys
                165                 170                 175

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

Asn Asp Ile Pro Lys Glu Gln Arg Ala Met Ile Thr Ser Glu Gly Ala
        195                 200                 205

Phe Lys Tyr Phe Ser Lys Gln Tyr Gly Ile Thr Pro Gly Tyr Ile Trp
    210                 215                 220

Glu Ile Asn Thr Glu Lys Gln Gly Thr Pro Glu Gln Met Arg Gln Ala
225                 230                 235                 240

Ile Glu Phe Val Lys Lys His Lys Leu Lys His Leu Leu Val Glu Thr
                245                 250                 255

Ser Val Asp Lys Lys Ala Met Glu Ser Leu Ser Glu Glu Thr Lys Lys
            260                 265                 270

Asp Ile Phe Gly Glu Val Tyr Thr Asp Ser Ile Gly Lys Glu Gly Thr
        275                 280                 285

Lys Gly Asp Ser Tyr Tyr Lys Met Met Lys Ser Asn Ile Glu Thr Val
    290                 295                 300

His Gly Ser Met Lys
305
```

<210> 135
<211> 930
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 135

atgaaaaaat tagtaccttt attattagcc ttattacttc tagttgctgc atgtggtact 60

ggtggtaaac aaagcagtga taagtcaaat ggcaaattaa aagtagtaac gacgaattca 120

attttatatg atatggctaa aaatgttggt ggagacaacg tcgatattca tagtattgta 180

cctgttggtc aagatcctca tgaatatgaa gttaaaccta aagatattaa aaagttaact 240

gacgctgacg ttatttttata caacggatta aatttagaga ctggtaacgg ttggtttgaa 300

aaagccttag aacaggctgg taaatcatta aaagataaaa aagttatcgc agtatcaaaa 360

gatgttaaac ctatctattt aaacggtgaa gaaggcaaca aagataaaca agatccacac 420

gcatggttaa gtttagataa tggtattaaa tacgtaaaaa caattcaaca aacatttatc 480

gataacgaca aaaaacataa agcagattat gaaaagcaag gtaacaaata cattgctcaa 540

ttggaaaaat taaataatga cagtaaagac aaatttaatg acattccaaa agaacaacgt 600

gccatgatta caagtgaagg tgccttcaag tacttctcaa aacaatacgg tattacacca 660

ggttatattt gggaaattaa cactgaaaaa caaggtacac ctgaacaaat gagacaagct 720

attgagtttg ttaaaaagca caaattaaaa cacttattag tagaaacaag tgttgataag 780

aaagcaatgg aaagtttatc tgaagaaacg aagaaagata tctttggtga agtgtacaca 840

gattcaatcg gtaaagaagg cactaaaggt gactcttact acaaaatgat gaaatcaaat 900

attgaaactg tacacggaag catgaaataa 930

<210> 136
<211> 876
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 136

atgggtactg gtggtaaaca aagcagtgat aagtcaaatg gcaaattaaa agtagtaacg 60

acgaattcaa ttttatatga tatggctaaa aatgttggtg gagacaacgt cgatattcat 120

agtattgtac ctgttggtca agatcctcat gaatatgaag ttaaacctaa agatattaaa 180

aagttaactg acgctgacgt tattttatac aacggattaa atttagagac tggtaacggt 240

tggtttgaaa aagccttaga acaggctggt aaatcattaa aagataaaaa agttatcgca 300

gtatcaaaag atgttaaacc tatctattta aacggtgaag aaggcaacaa agataaacaa 360

gatccacacg catggttaag tttagataat ggtattaaat acgtaaaaac aattcaacaa 420

acatttatcg ataacgacaa aaaacataaa gcagattatg aaaagcaagg taacaaatac 480

attgctcaat tggaaaaatt aaataatgac agtaaagaca aatttaatga cattccaaaa 540

gaacaacgtg ccatgattac aagtgaaggt gccttcaagt acttctcaaa acaatacggt 600

attacaccag gttatatttg ggaaattaac actgaaaaac aaggtacacc tgaacaaatg 660

agacaagcta ttgagtttgt taaaaagcac aaattaaaac acttattagt agaaacaagt 720

gttgataaga aagcaatgga aagtttatct gaagaaacga agaaagatat ctttggtgaa 780

gtgtacacag attcaatcgg taaagaaggc actaaaggtg actcttacta caaaatgatg 840

aaatcaaata ttgaaactgt acacggaagc atgaaa 876

<210> 137
<211> 876
<212> ADN
<213> *Staphylococcus epidermidis*

<400> 137

atggggaatc acagtaacca tgaacatcac tcacatgaag gaaaattaaa agttgtaact 60

acaaactcta ttctctatga catggttaaa cgtgtcggtg gaaataaggt cgatgttcat 120

agcatcgttc cagtaggaca agatccacat gaatatgagg ttaaacctaa agatattaaa 180

gcattaacag atgctgacgt tgtattttat aatggtttaa acctagaaac tggaaatggt 240

tggtttgaaa aagcacttga ccaagcagga aaatcaacaa aagataaaaa tgtgatagca 300

gcatcaaata atgttaaacc aatatactta aatggtgagg aaggtaacaa aaacaaacaa 360

gatccacatg catggttaag tttagagaat ggaattaaat acgtaaaaac aatacaaaaa 420

tcactagaac atcatgataa aaaagataag tctacatatg aaaaacaagg gaatgcatat 480

atatcaaaat tagaagaact taataaagat agtaaaaata aatttgatga catacccaaa 540

aatcaacgtg ccatgatgac aagtgaaggt gcatttaaat attttgctca acaattcgat 600

gttaaaccag gttatatttg ggagataaac acagaaaaac aaggtacacc tggtcaaatg 660

aaacaagcca ttaaatttgt taaagataat catttaaaac atttattagt cgaaacaagc 720

gtagataaaa aagctatgca aagtttatca gaagaaacta agaaagatat ttatggtgaa 780

gtatttaccg actctatagg taaggaaggt actaaaggtg actcatacta taaaatgatg 840

aaatctaata ttgatacaat acatggtagt atgaaa 876

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica líquida preparada reconstituyendo una composición inmunogénica liofilizada que comprende: (a) un polipéptido factor aglutinante A (ClfA) de *Staphylococcus aureus* aislado, en la que el polipéptido ClfA comprende un dominio N1, N2 y N3, (b) un polipéptido MntC de *Staphylococcus aureus* aislado, (c) un conjugado Polisacárido Capsular de Tipo 5 (PC5)-CRM_{197}, (d) un conjugado Polisacárido Capsular de Tipo 8 (PC8)-CRM_{197}, (e) un tampón que tiene un pKa de 6,0 ± 0,6, y (f) un agente de carga, con un diluyente acuoso, en la que dicha composición inmunogénica tiene un pH final de 6,0 ± 0,5.

2. La composición inmunogénica líquida de la reivindicación 1, en la que la composición inmunogénica líquida comprende:

(a) el polipéptido ClfA a una concentración de entre 40 µg/ml ± 4 µg/ml y 800 µg/ml ± 80 µg/ml;
(b) el conjugado PC5-CRM_{197} a una concentración de entre 20 µg/ml ± 2 µg/ml y 400 µg/ml ± 40 µg/ml;
(c) el conjugado PC8-CRM_{197} a una concentración de entre 20 µg/ml ± 2 µg/ml y 400 µg/ml ± 40 µg/ml;
(d) tampón de histidina a una concentración de 10 mM ± 5 mM;
(e) polisorbato 80 a una concentración del 0,01 % ± el 0,005 % en peso a volumen (p/v); y
(f) sacarosa a una concentración del 9 % ± el 4,5 % p/v.

3. La composición inmunogénica liofilizada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que la composición inmunogénica líquida comprende adicionalmente un polipéptido factor aglutinante B (ClfB) de *Staphylococcus aureus* aislado a una concentración de entre 40 µg/ml ± 4 µg/ml y 800 µg/ml ± 80 µg/ml.

4. La composición inmunogénica líquida de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el dominio de unión a fibrinógeno del polipéptido ClfA presenta una unión reducida a fibrinógeno por medio de tener una sustitución de aminoácido en uno o más de Tyr 338, Tyr 256, Pro 336, Lys 389, Ala 254 e Ile 387.

5. La composición inmunogénica líquida de la reivindicación 4, en la que la sustitución de aminoácido en uno o más de Tyr 338, Tyr 256, Pro 336, Lys 389, Ala 254 e Ile 387 es en Ala o Ser.

6. La composición inmunogénica líquida de la reivindicación 5, en la que la Tyr 338 está sustituida en Ala.

FIGURA 1

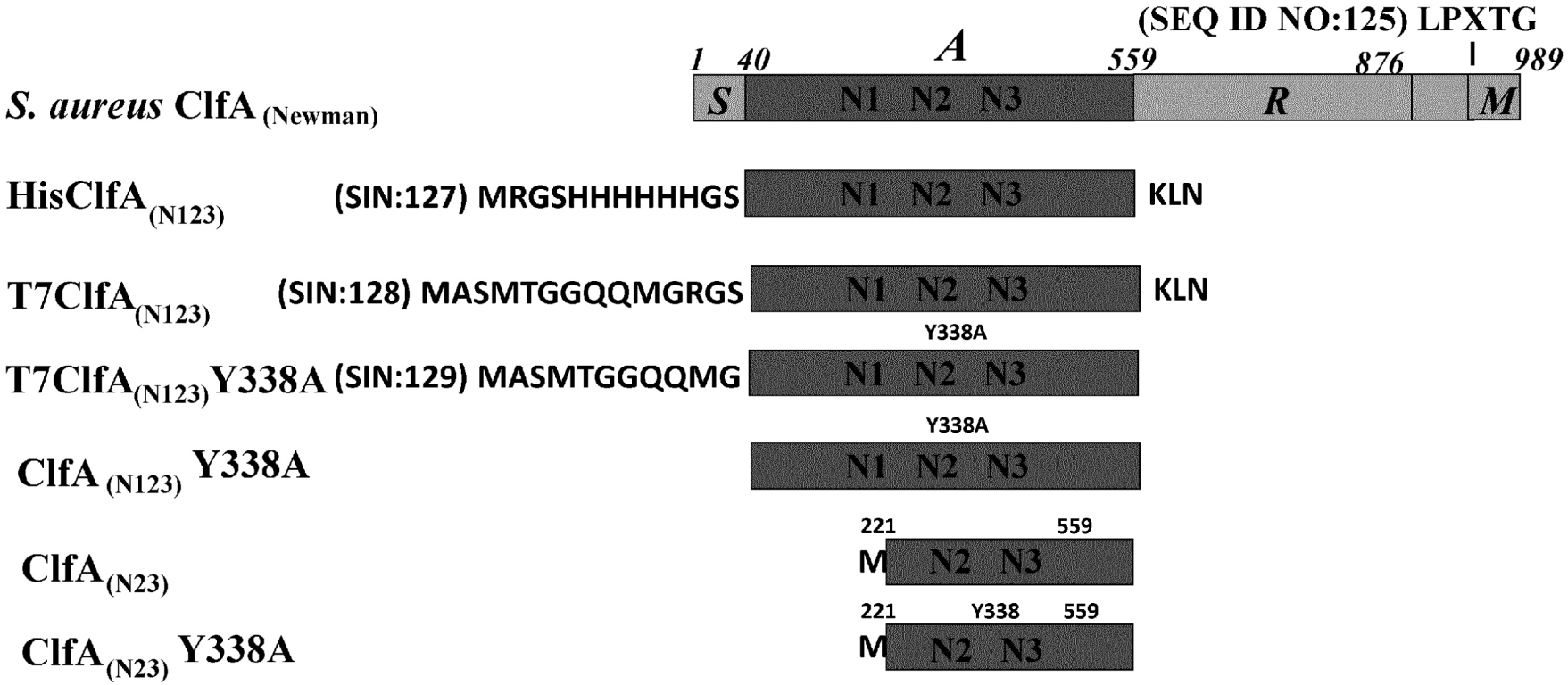

(SEQ ID NO:125) LPXTG
1
40
A
559
876
989
S. aureus ClfA (Newman)
S
N1 N2 N3
R
M
HisClfA(N123)
(SIN:127) MRGSHHHHHHGS
N1 N2 N3
KLN
T7ClfA(N123)
(SIN:128) MASMTGGQQMGRGS
N1 N2 N3
KLN
Y338A
T7ClfA(N123)Y338A
(SIN:129) MASMTGGQQMG
N1 N2 N3
Y338A
ClfA (N123) Y338A
N1 N2 N3
221
559
ClfA(N23)
M
N2 N3
221
Y338
559
ClfA(N23) Y338A
M
N2 N3

FIGURA 2A

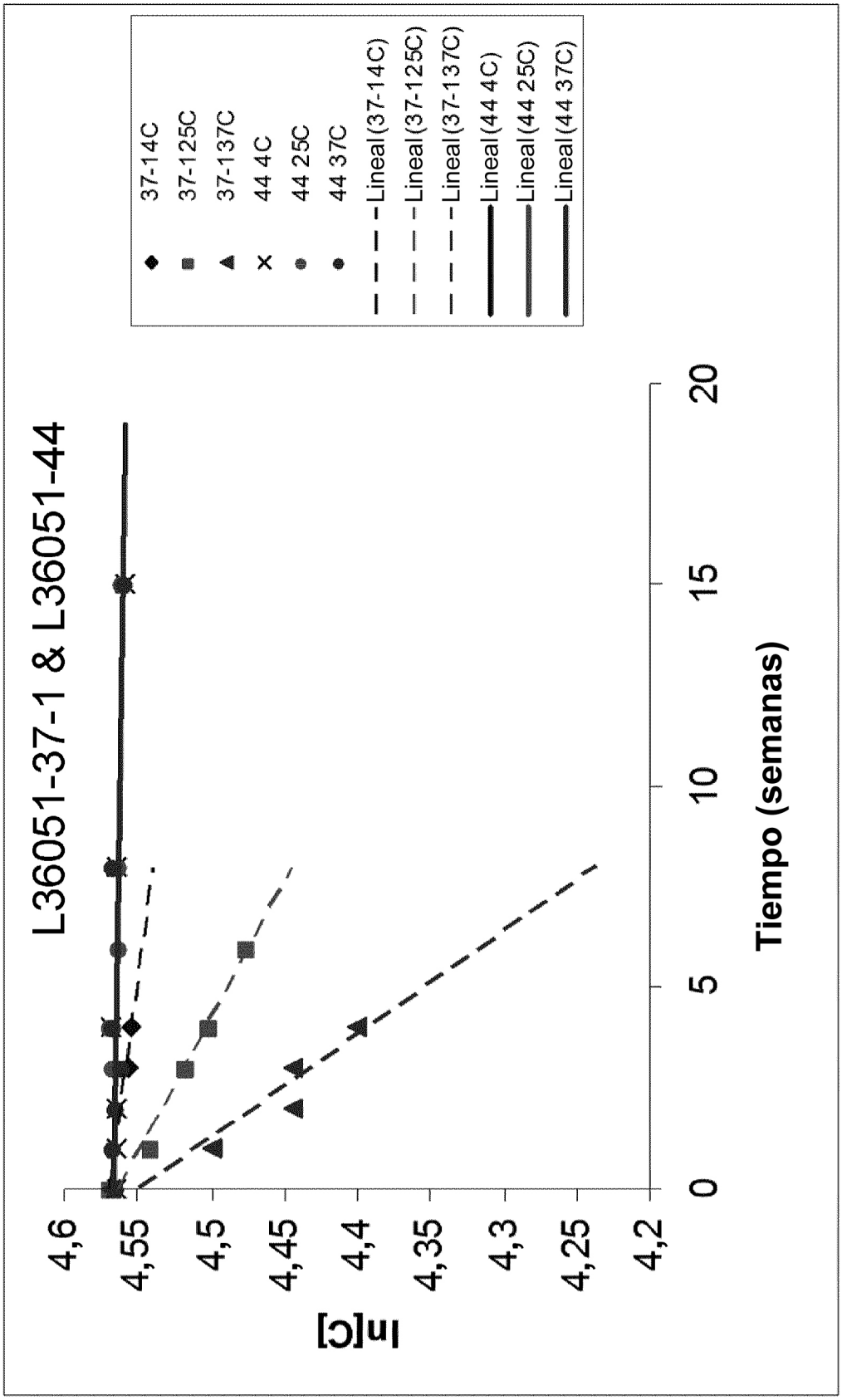

L36051-37-1 & L36051-44
ln[c]
Tiempo (semanas)
4,6
4,55
4,5
4,45
4,4
4,35
4,3
4,25
4,2
0
5
10
15
20
37-14C
37-125C
37-137C
44 4C
44 25C
44 37C
Lineal(37-14C)
Lineal(37-125C)
Lineal(37-137C)
Lineal(44 4C)
Lineal(44 25C)
Lineal(44 37C)

FIGURA 2B

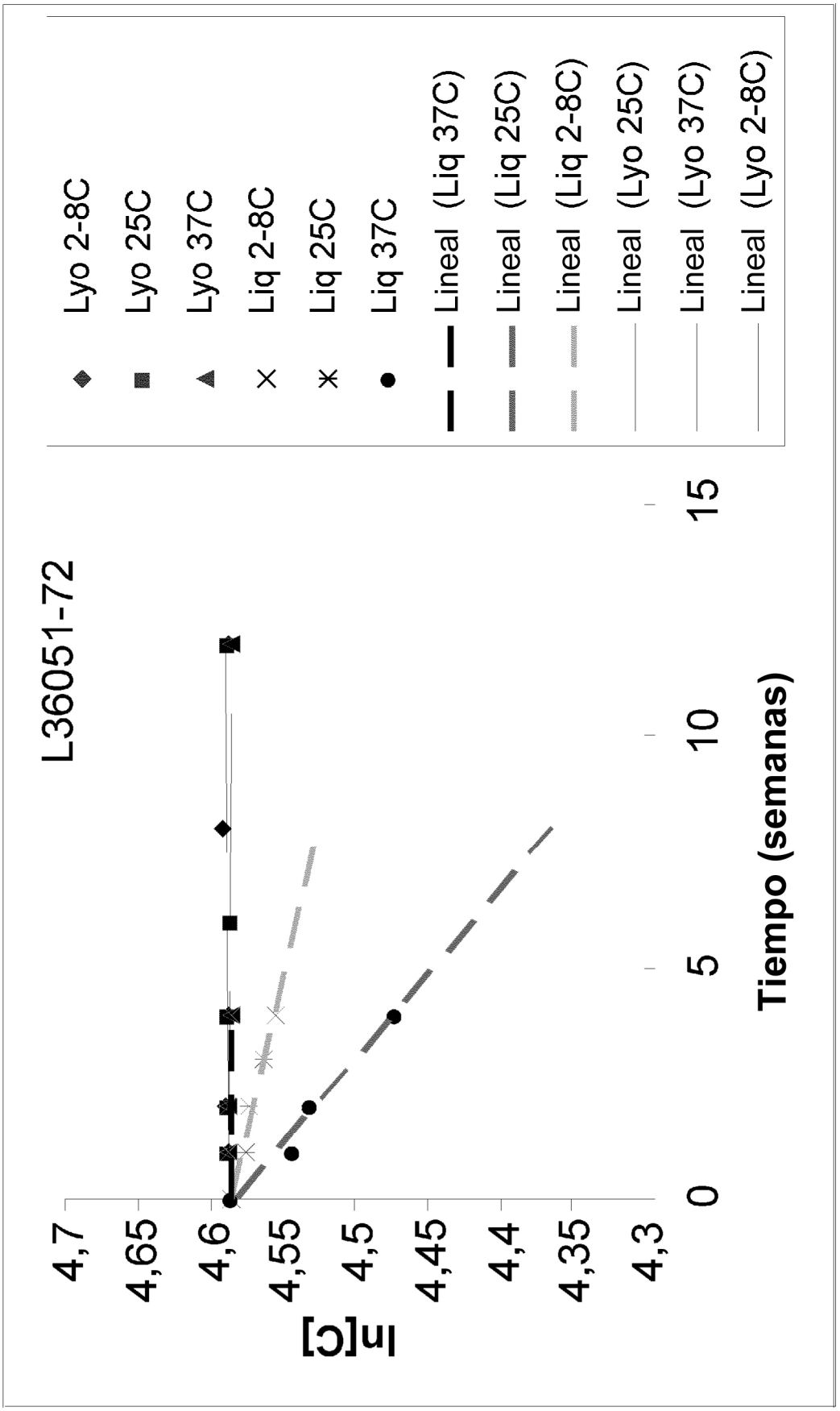

L36051-72
ln[c]
4,7
4,65
4,6
4,55
4,5
4,45
4,4
4,35
4,3
0
5
10
15
Tiempo (semanas)
Lyo 2-8C
Lyo 25C
Lyo 37C
Liq 2-8C
Liq 25C
Liq 37C
Lineal (Liq 37C)
Lineal (Liq 25C)
Lineal (Liq 2-8C)
Lineal (Lyo 25C)
Lineal (Lyo 37C)
Lineal (Lyo 2-8C)

FIGURA 2C

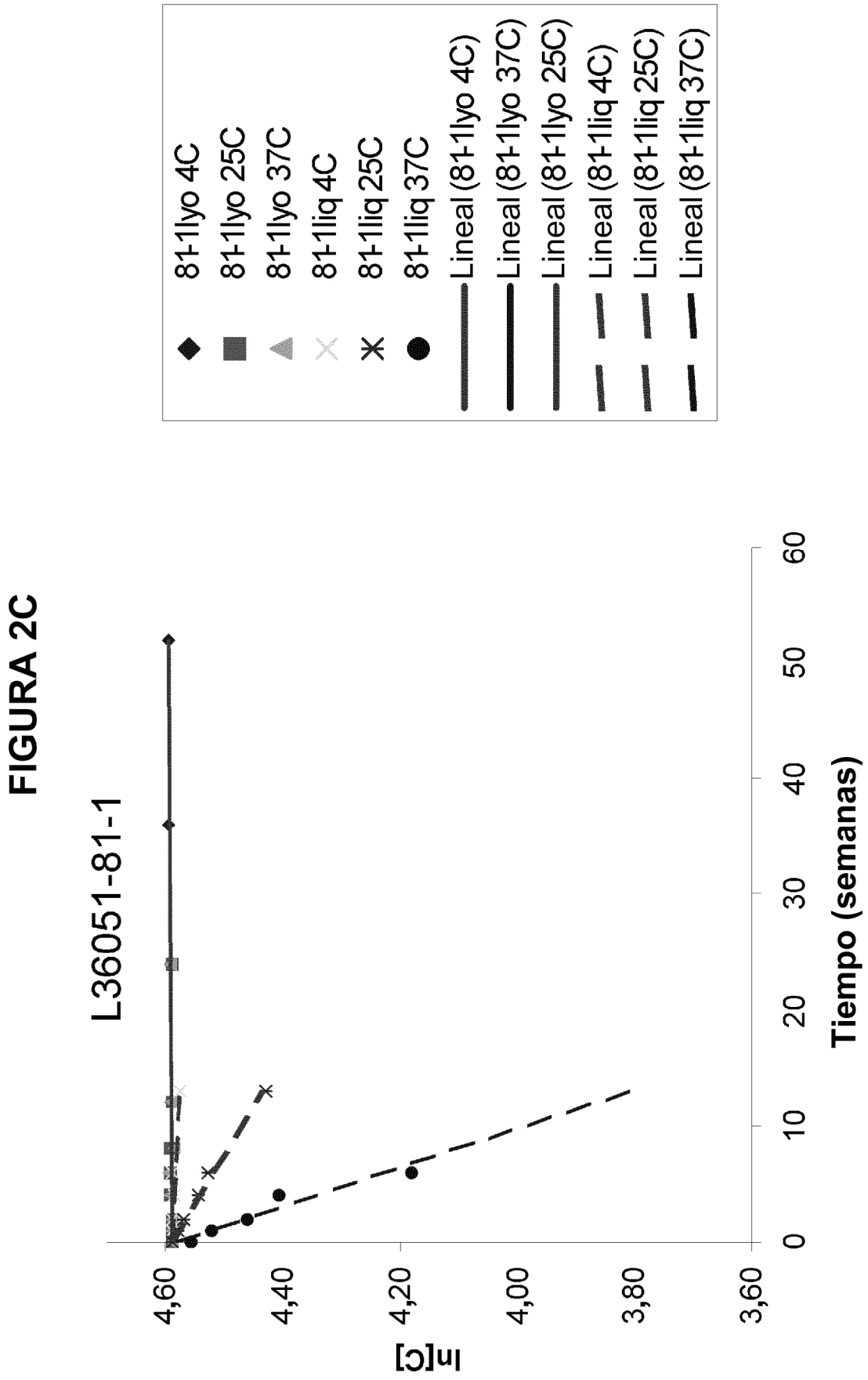

L36051-81-1
81-1lyo 4C
81-1lyo 25C
81-1lyo 37C
81-1liq 4C
81-1liq 25C
81-1liq 37C
Lineal (81-1lyo 4C)
Lineal (81-1lyo 37C)
Lineal (81-1lyo 25C)
Lineal (81-1liq 4C)
Lineal (81-1liq 25C)
Lineal (81-1liq 37C)
ln[C]
4,60
4,40
4,20
4,00
3,80
3,60
0
10
20
30
40
50
60
Tiempo (semanas)

FIGURA 2D

L36051-81-2

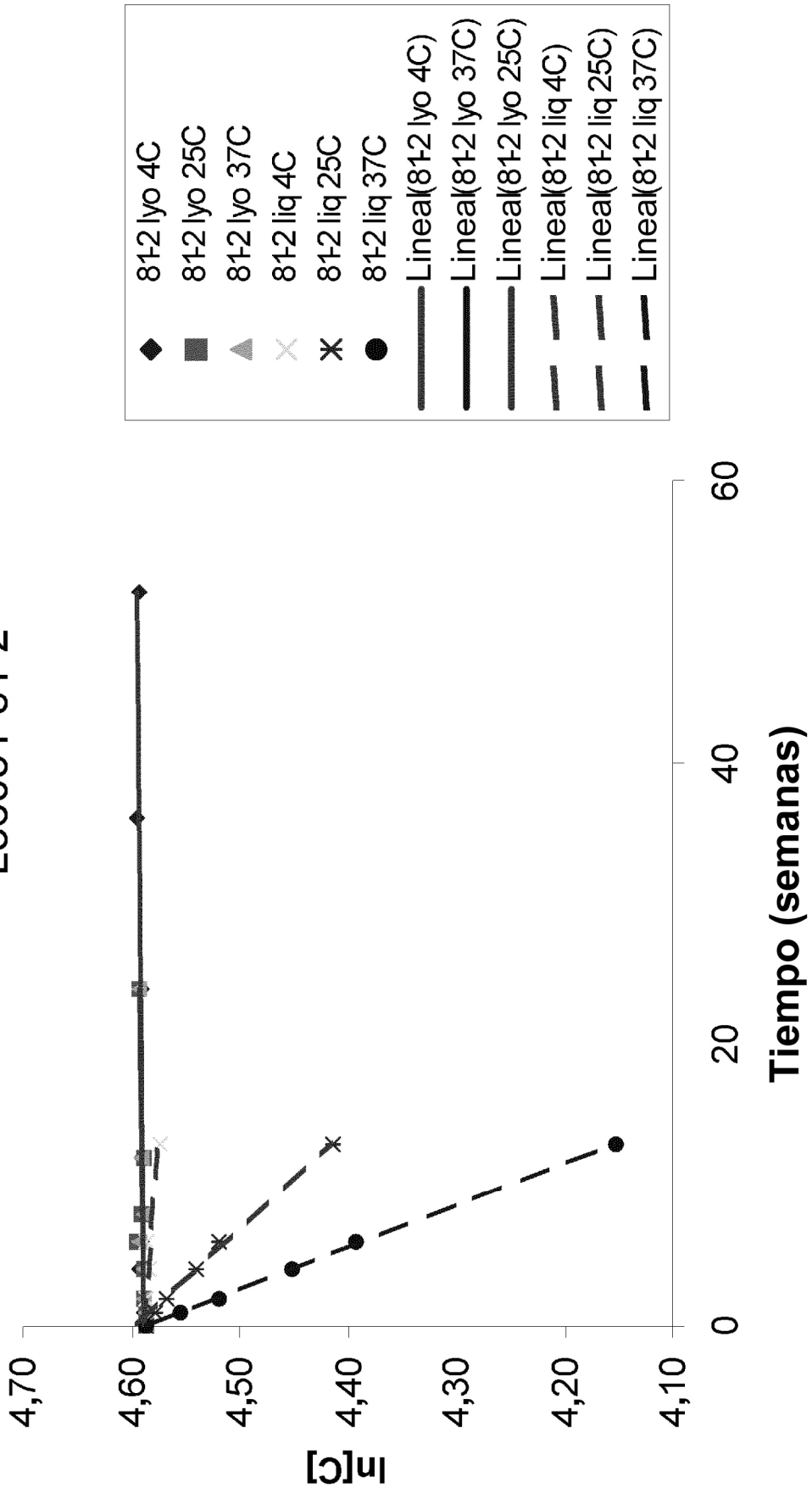


FIGURA 3

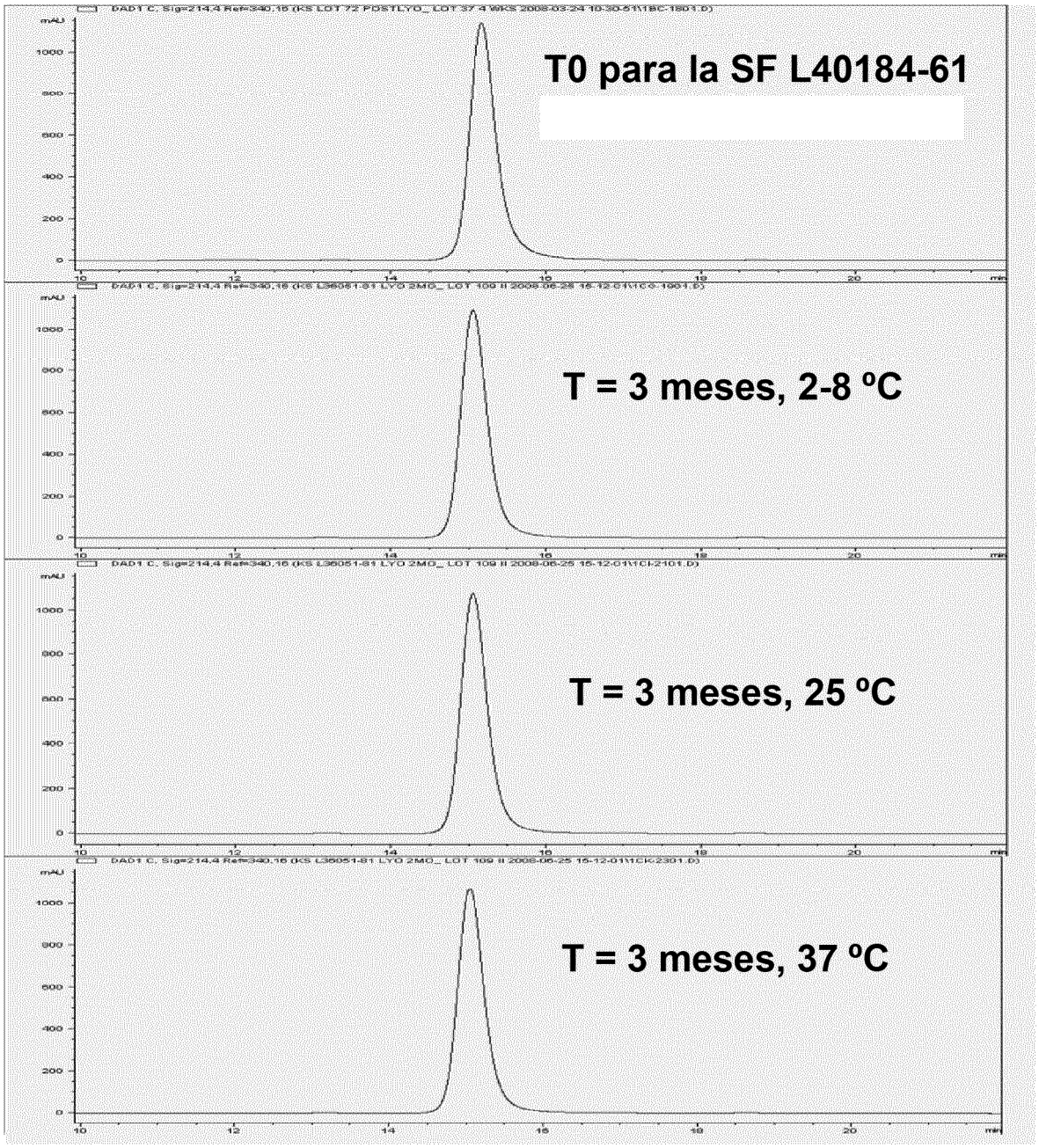

T0 para la SF L40184-61
T = 3 meses, 2-8 ºC
T = 3 meses, 25 ºC
T = 3 meses, 37 ºC

FIGURA 4

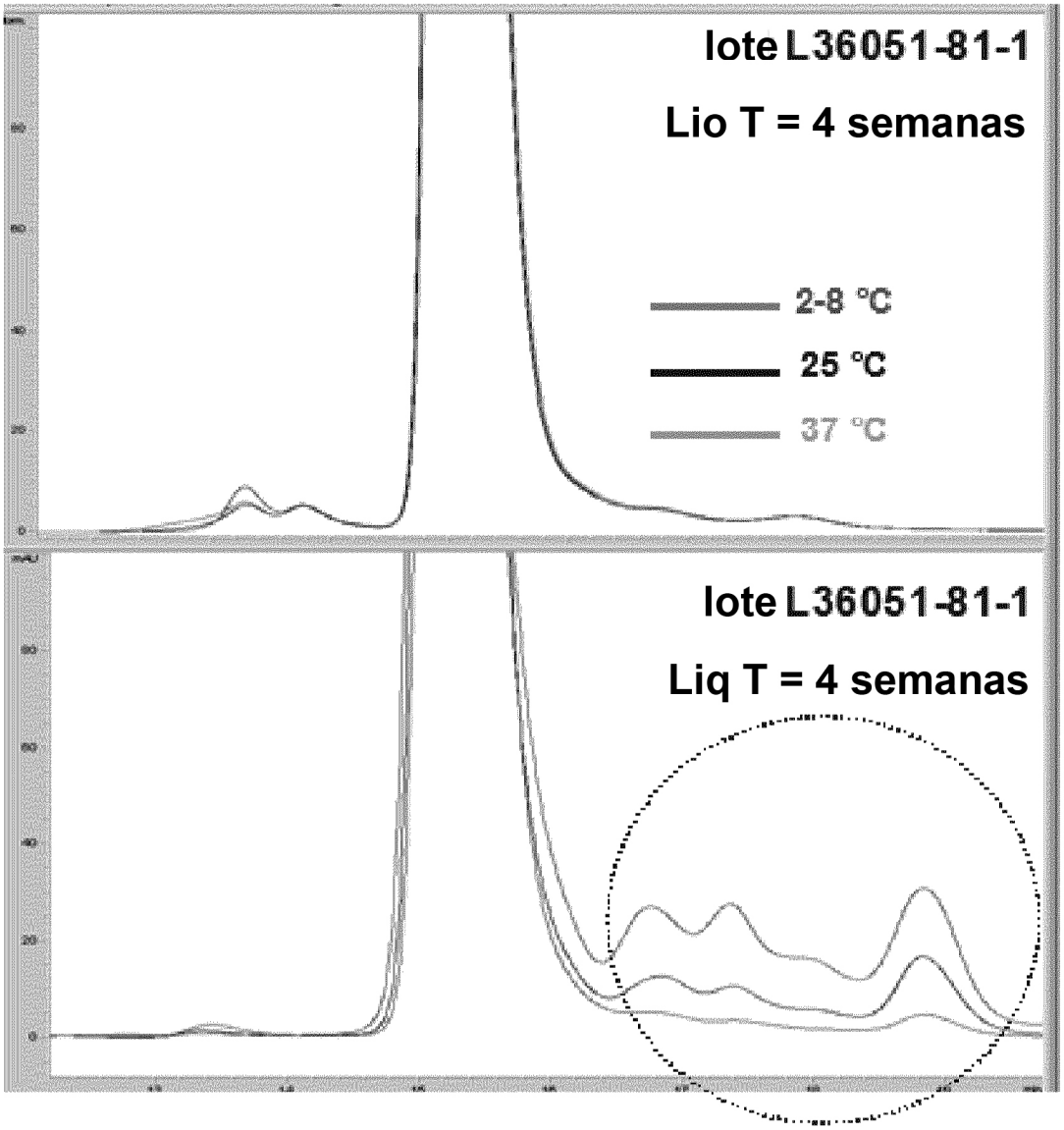

lote L36051-81-1
Lio T = 4 semanas
2-8 °C
25 °C
37 °C
lote L36051-81-1
Liq T = 4 semanas

FIGURA 5A

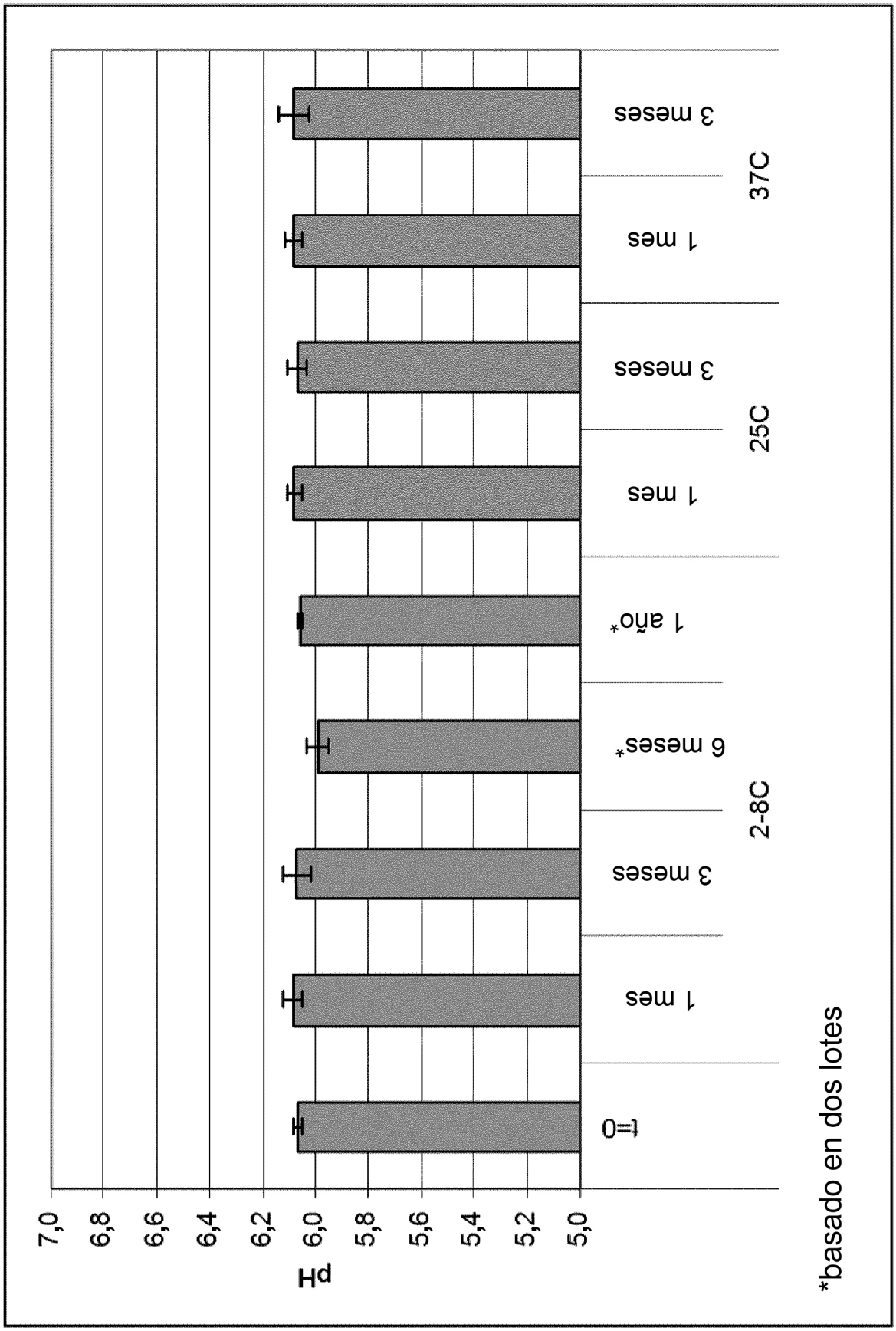

pH
7,0
6,8
6,6
6,4
6,2
6,0
5,8
5,6
5,4
5,2
5,0
t=0
1 mes
3 meses
6 meses*
1 año*
1 mes
3 meses
1 mes
3 meses
2-8C
25C
37C
*basado en dos lotes

FIGURA 5B

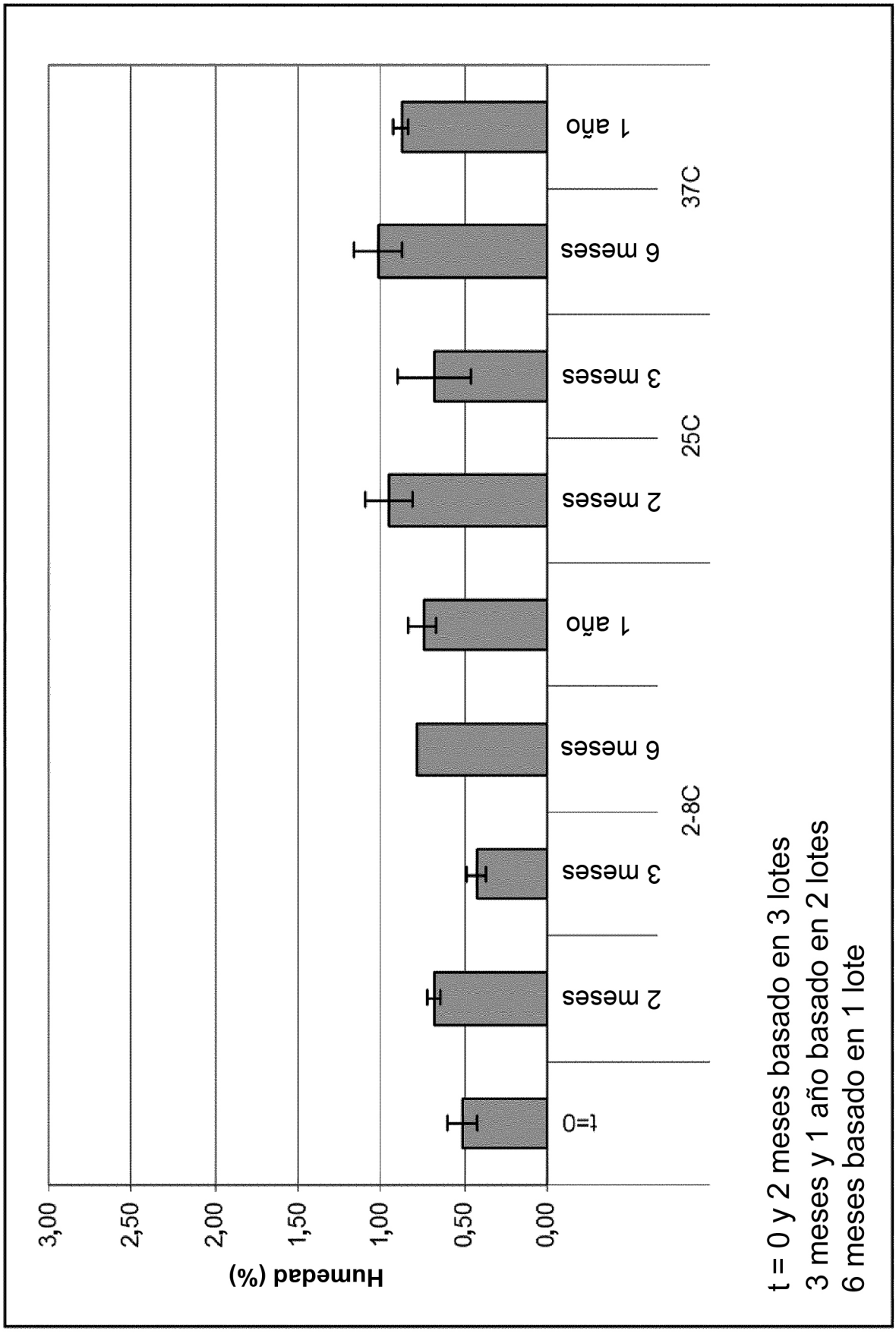

Humedad (%)
3,00
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
t=0
2 meses
3 meses
6 meses
1 año
2 meses
3 meses
6 meses
1 año
2-8C
25C
37C
t = 0 y 2 meses basado en 3 lotes
3 meses y 1 año basado en 2 lotes
6 meses basado en 1 lote

FIGURA 5C

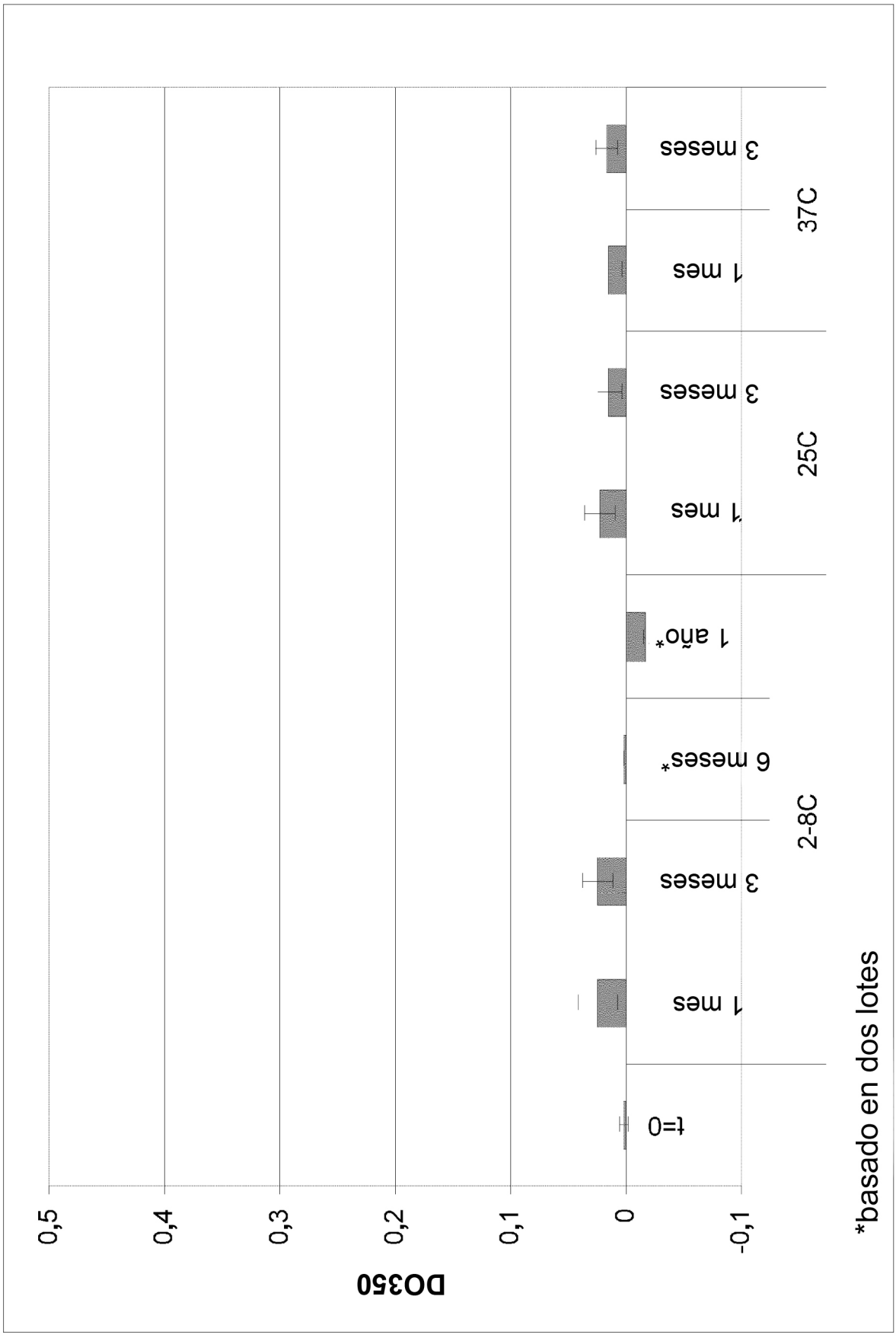

DO350
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
-0,1
t=0
1 mes
3 meses
6 meses*
1 año*
1 mes
3 meses
1 mes
3 meses
2-8C
25C
37C
*basado en dos lotes

FIGURA 6A

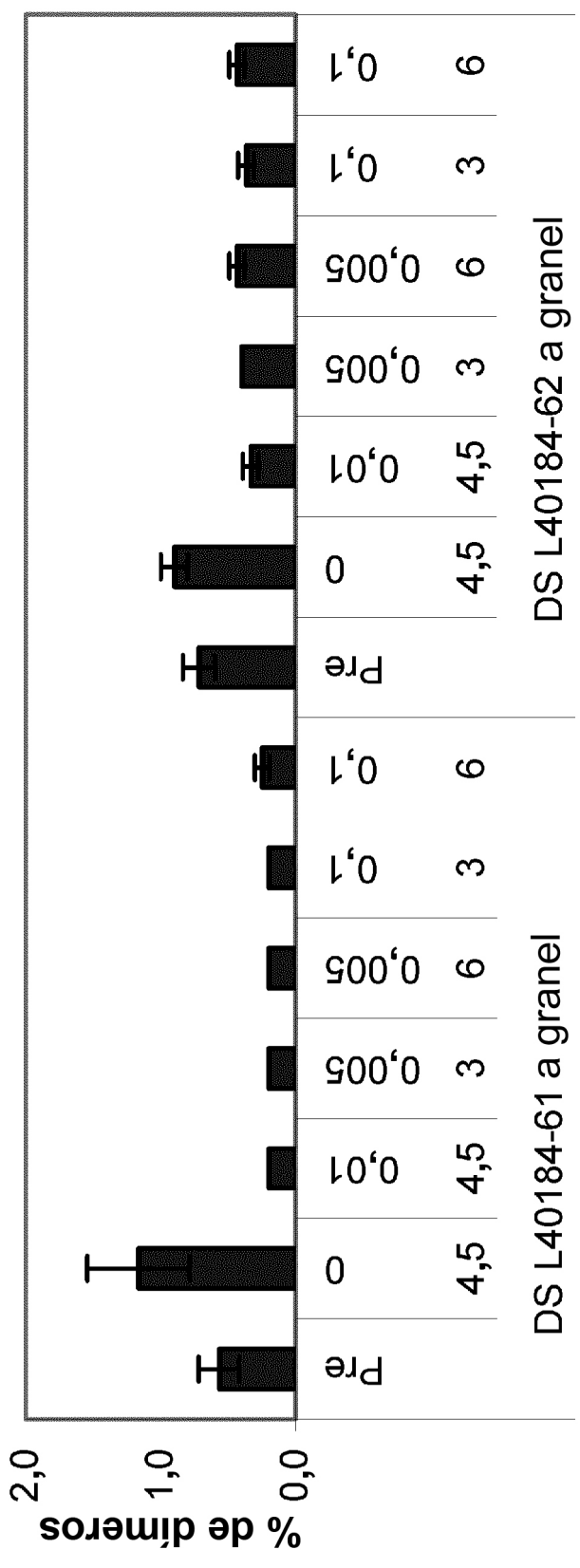

% de dímeros
2,0
1,0
0,0
Pre
0
4,5
0,01
4,5
0,005
3
0,005
6
0,1
3
0,1
6
DS L40184-61 a granel
Pre
0
4,5
0,01
4,5
0,005
3
0,005
6
0,1
3
0,1
6
DS L40184-62 a granel

FIGURA 6B

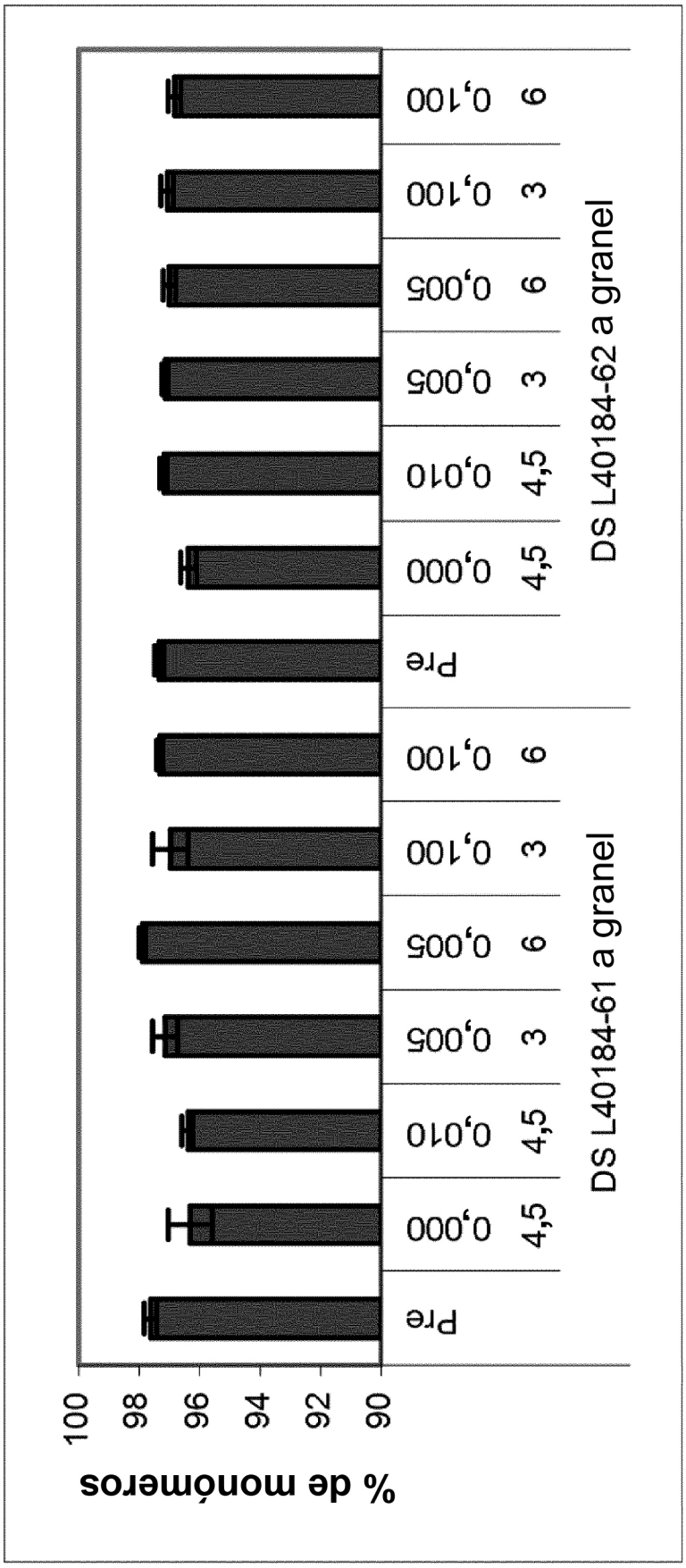

% de monómeros
100
98
96
94
92
90
Pre
0,000
4,5
0,010
4,5
0,005
3
0,005
6
0,100
3
0,100
6
DS L40184-61 a granel
Pre
0,000
4,5
0,010
4,5
0,005
3
0,005
6
0,100
3
0,100
6
DS L40184-62 a granel

FIGURA 6C

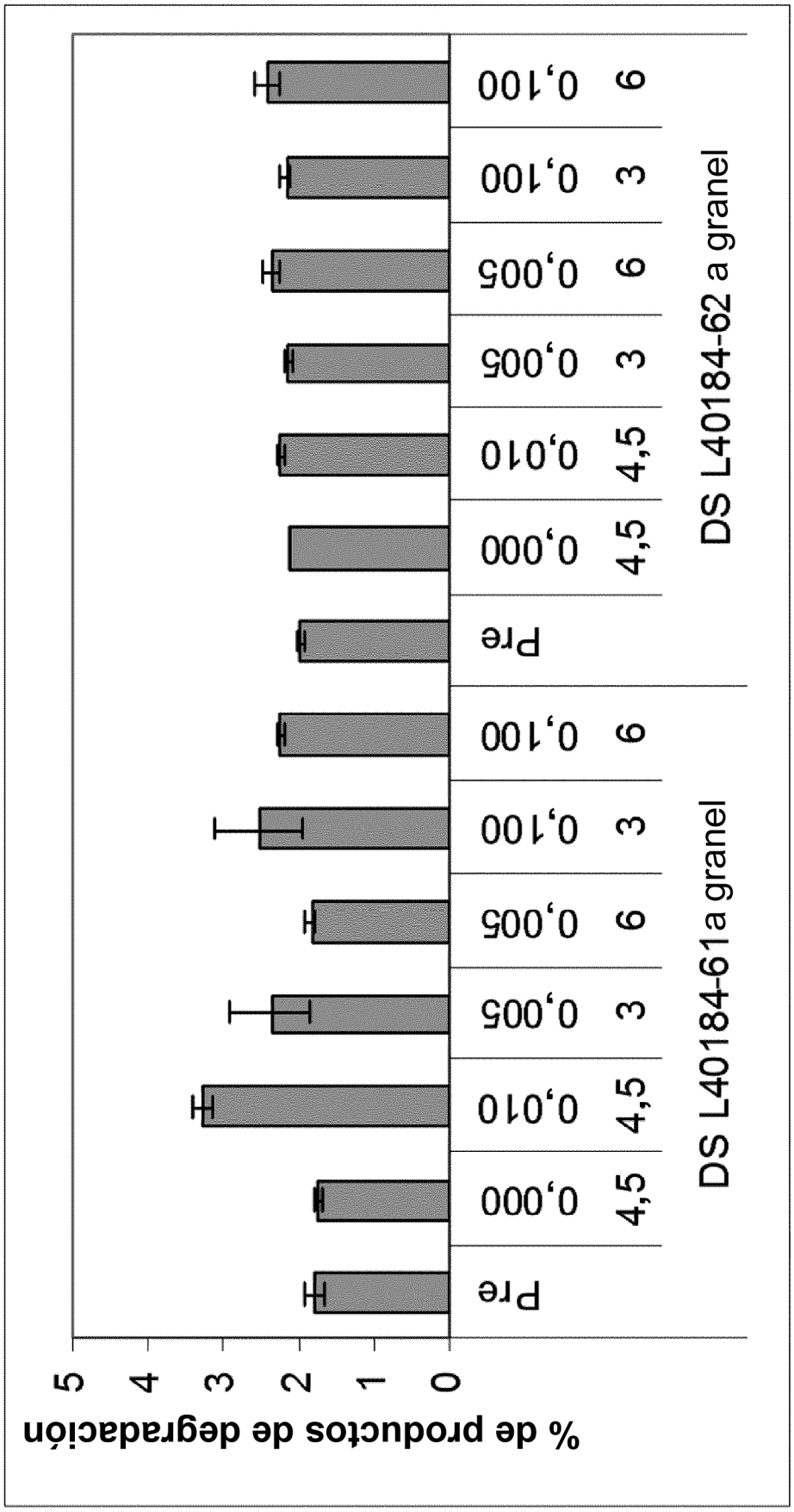

% de productos de degradación
0
1
2
3
4
5
Pre
0,000
4,5
0,010
4,5
0,005
3
0,005
6
0,100
3
0,100
6
DS L40184-61a granel
Pre
0,000
4,5
0,010
4,5
0,005
3
0,005
6
0,100
3
0,100
6
DS L40184-62 a granel

FIGURA 6D

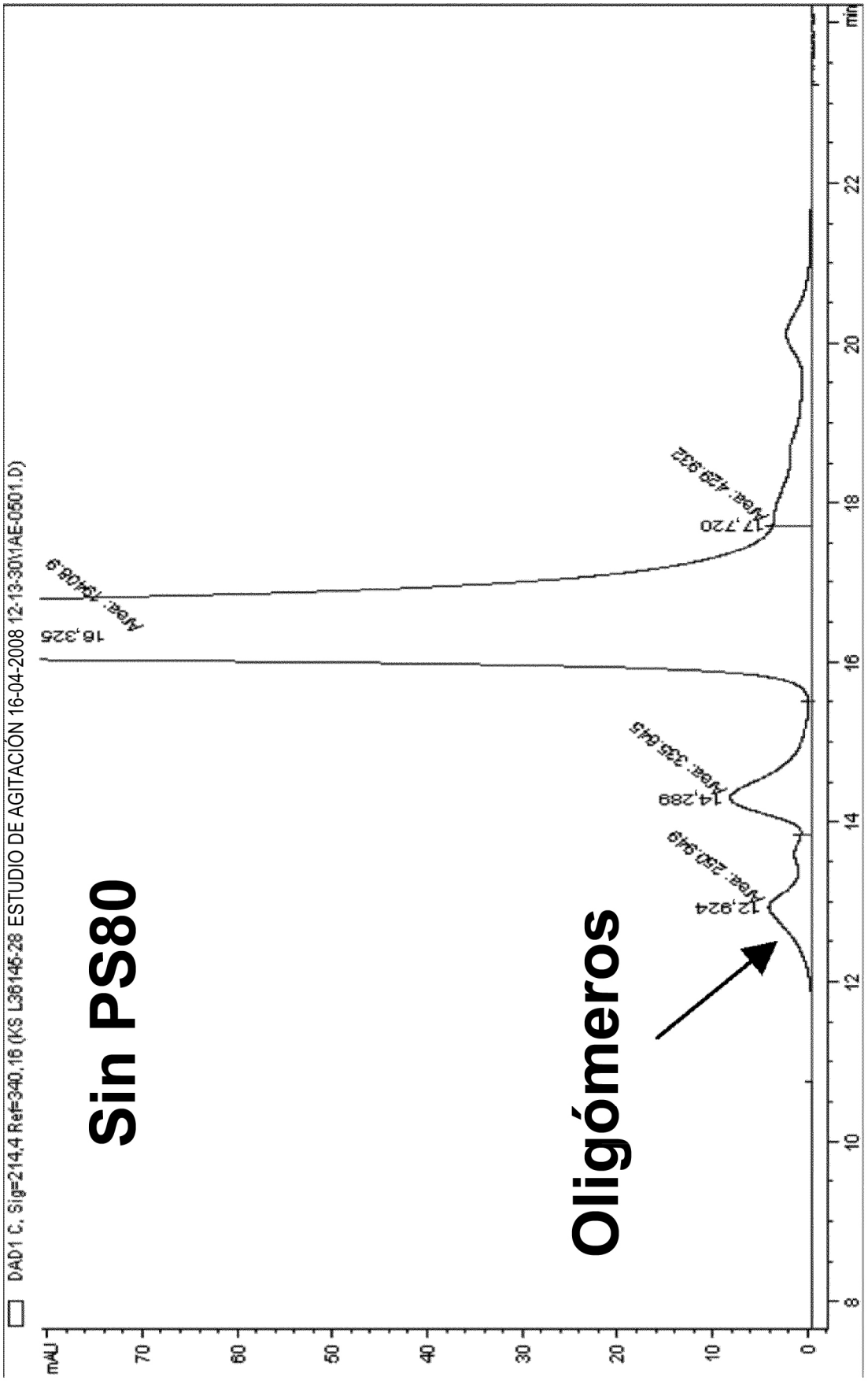

DAD1 C, Sig=214,4 Ref=340,16 (KS L36145-28 ESTUDIO DE AGITACIÓN 16-04-2008 12-13-30\1AE-0501.D)
mAU
min
Sin PS80
Oligómeros
16,325
Área: 75408,9
17,720
Área: 429,922
14,289
Área: 335,645
12,924
Área: 250,949

FIGURA 7A

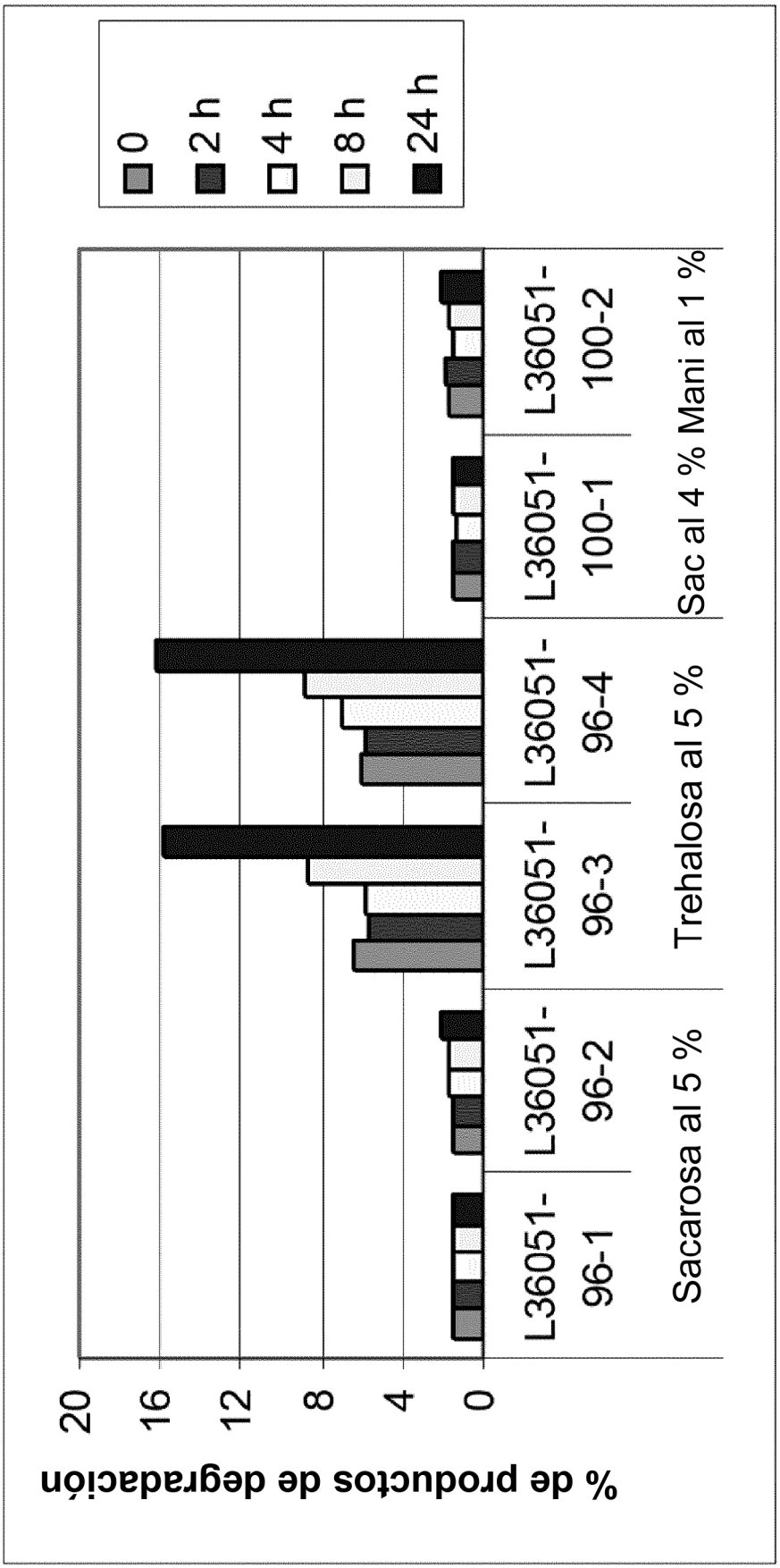

% de productos de degradación
20
16
12
8
4
0
0
2 h
4 h
8 h
24 h
L36051-96-1
L36051-96-2
L36051-96-3
L36051-96-4
L36051-100-1
L36051-100-2
Sacarosa al 5 %
Trehalosa al 5 %
Sac al 4 % Mani al 1 %

FIGURA 7B

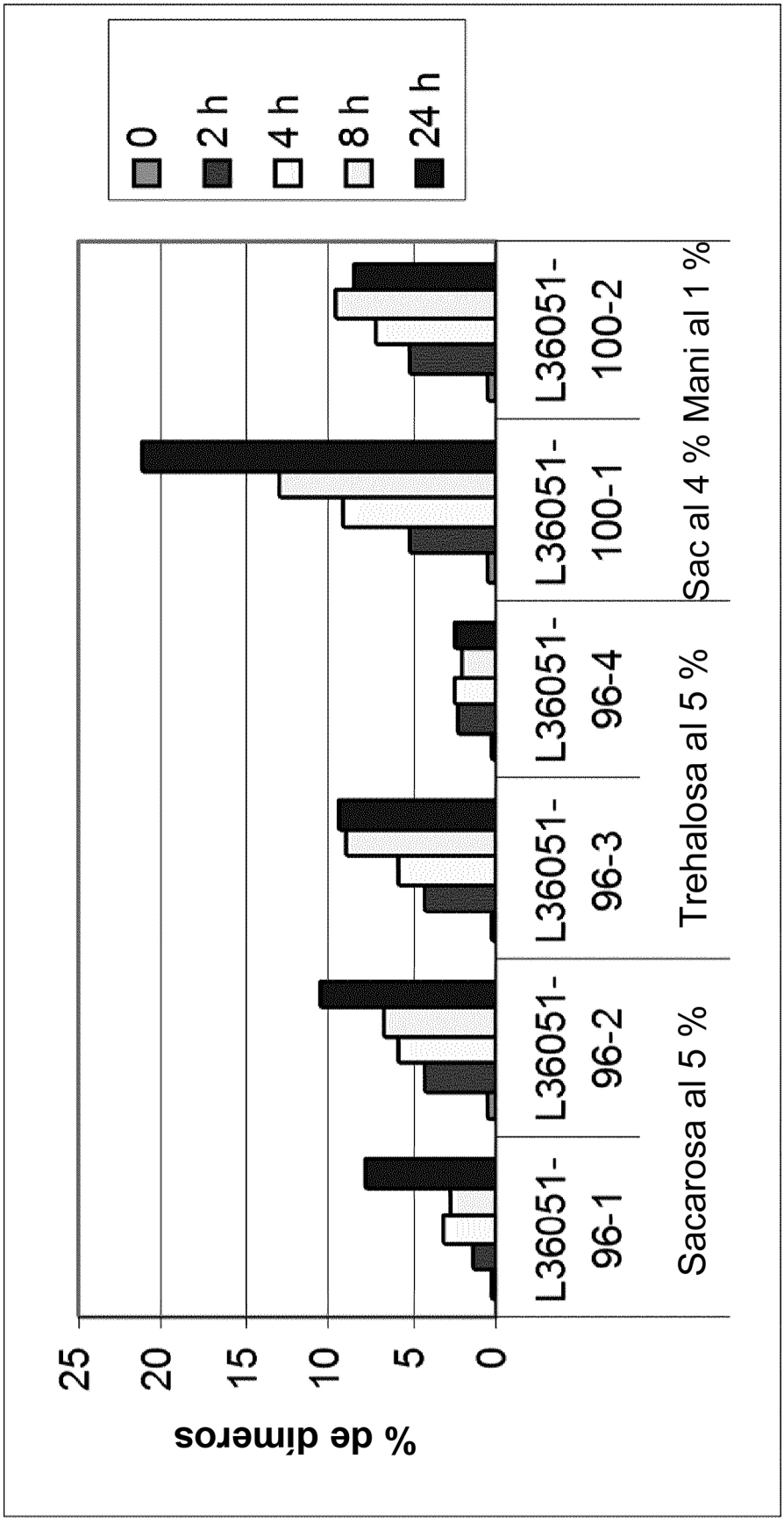

0
2 h
4 h
8 h
24 h
% de dímeros
25
20
15
10
5
0
L36051-96-1
L36051-96-2
L36051-96-3
L36051-96-4
L36051-100-1
L36051-100-2
Sacarosa al 5 %
Trehalosa al 5 %
Sac al 4 % Mani al 1 %

FIGURA 7C

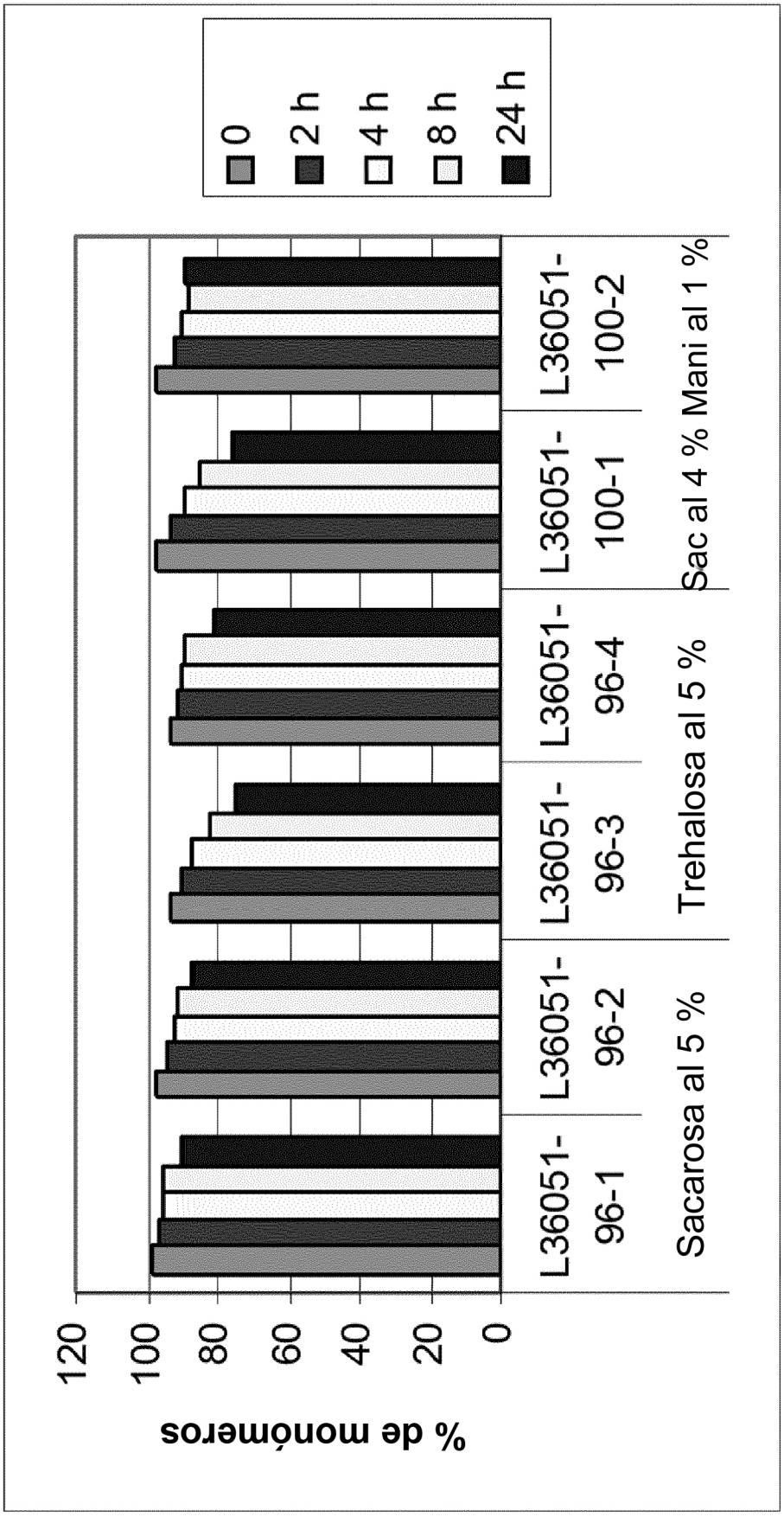

0
2 h
4 h
8 h
24 h
% de monómeros
120
100
80
60
40
20
0
L36051-96-1
L36051-96-2
L36051-96-3
L36051-96-4
L36051-100-1
L36051-100-2
Sacarosa al 5 %
Trehalosa al 5 %
Sac al 4 % Mani al 1 %

FIGURA 8A

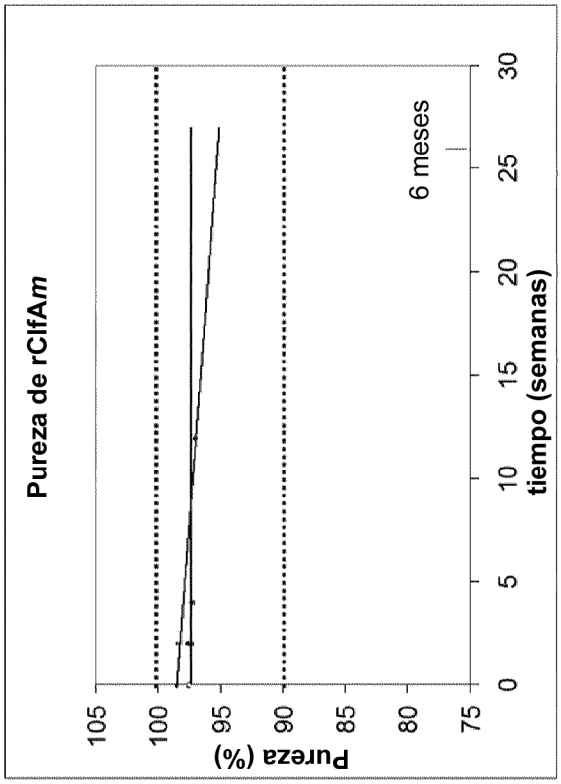
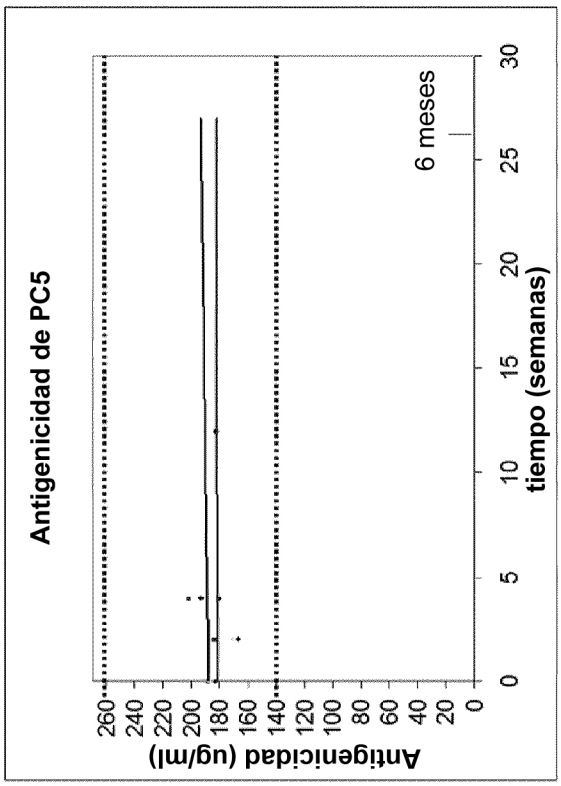


FIGURA 8B



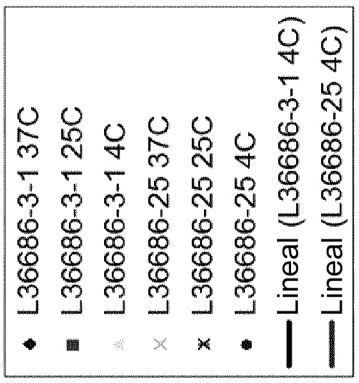


FIGURA 8C

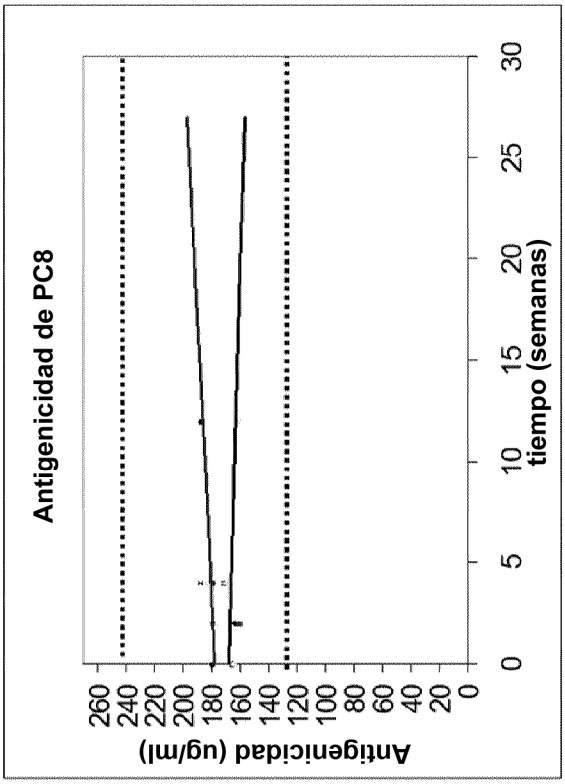


FIGURA 9A

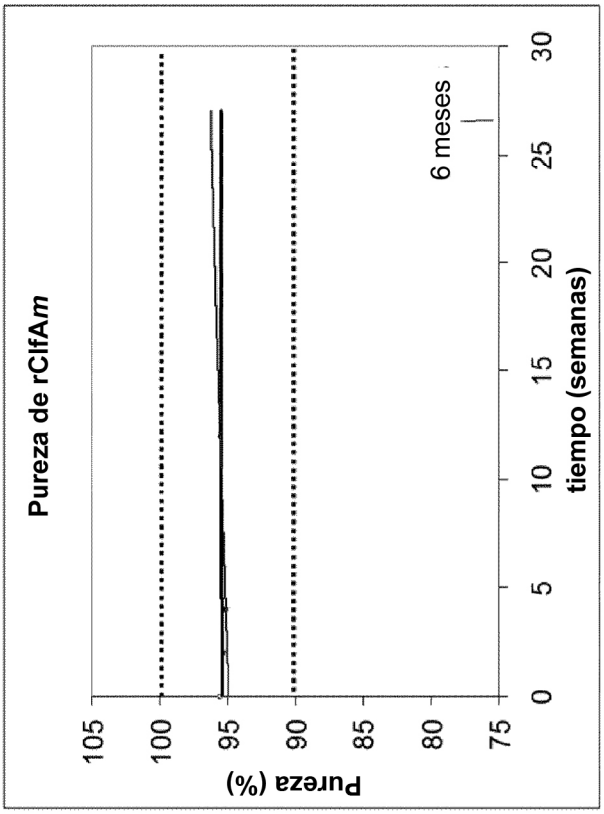
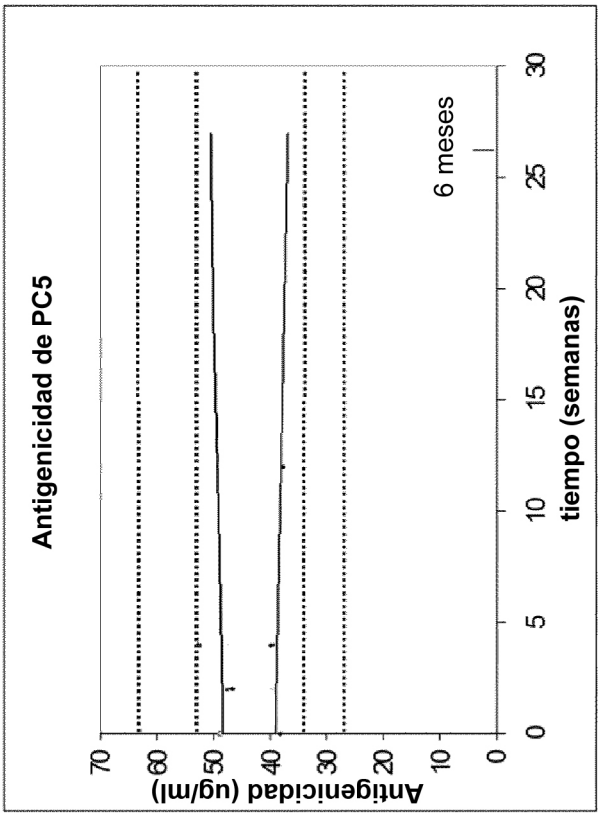
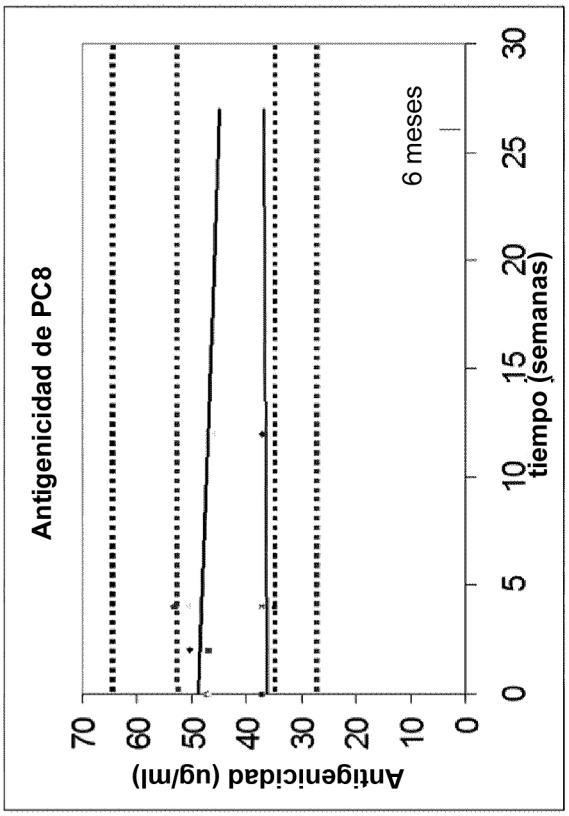


FIGURA 9B





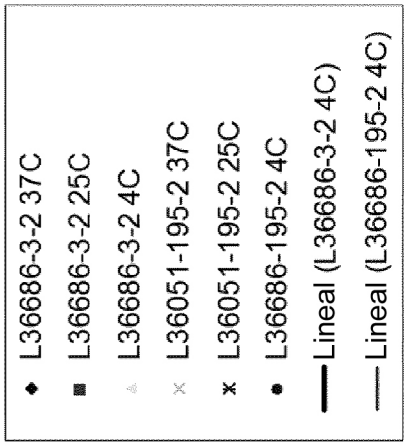


FIGURA 9C

FIGURA 10A

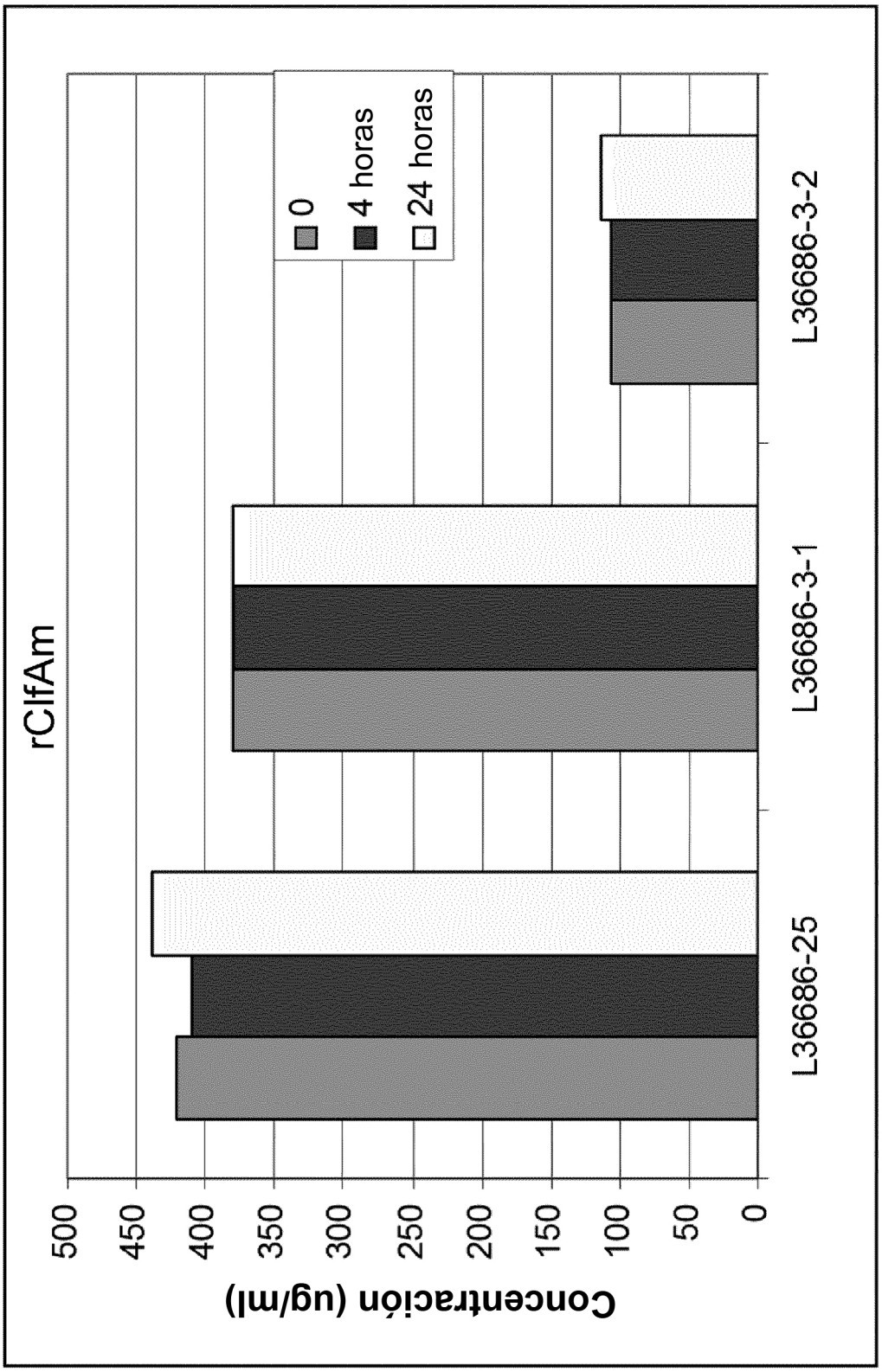

rClfAm
Concentración (ug/ml)
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0
4 horas
24 horas
L36686-25
L36686-3-1
L36686-3-2

FIGURA 10B

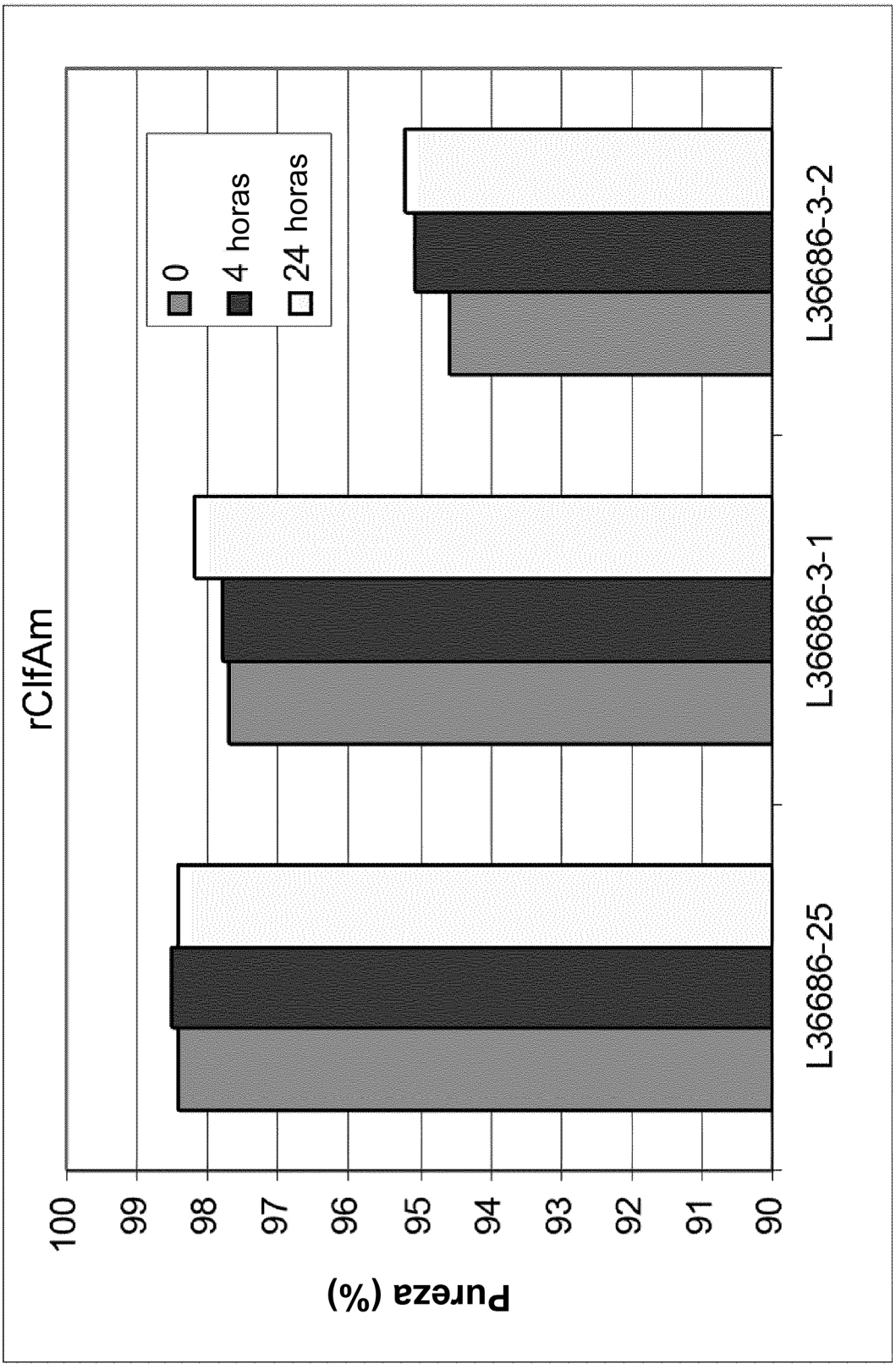

rClfAm
0
4 horas
24 horas
L36686-25
L36686-3-1
L36686-3-2
Pureza (%)
100
99
98
97
96
95
94
93
92
91
90

FIGURA 10C

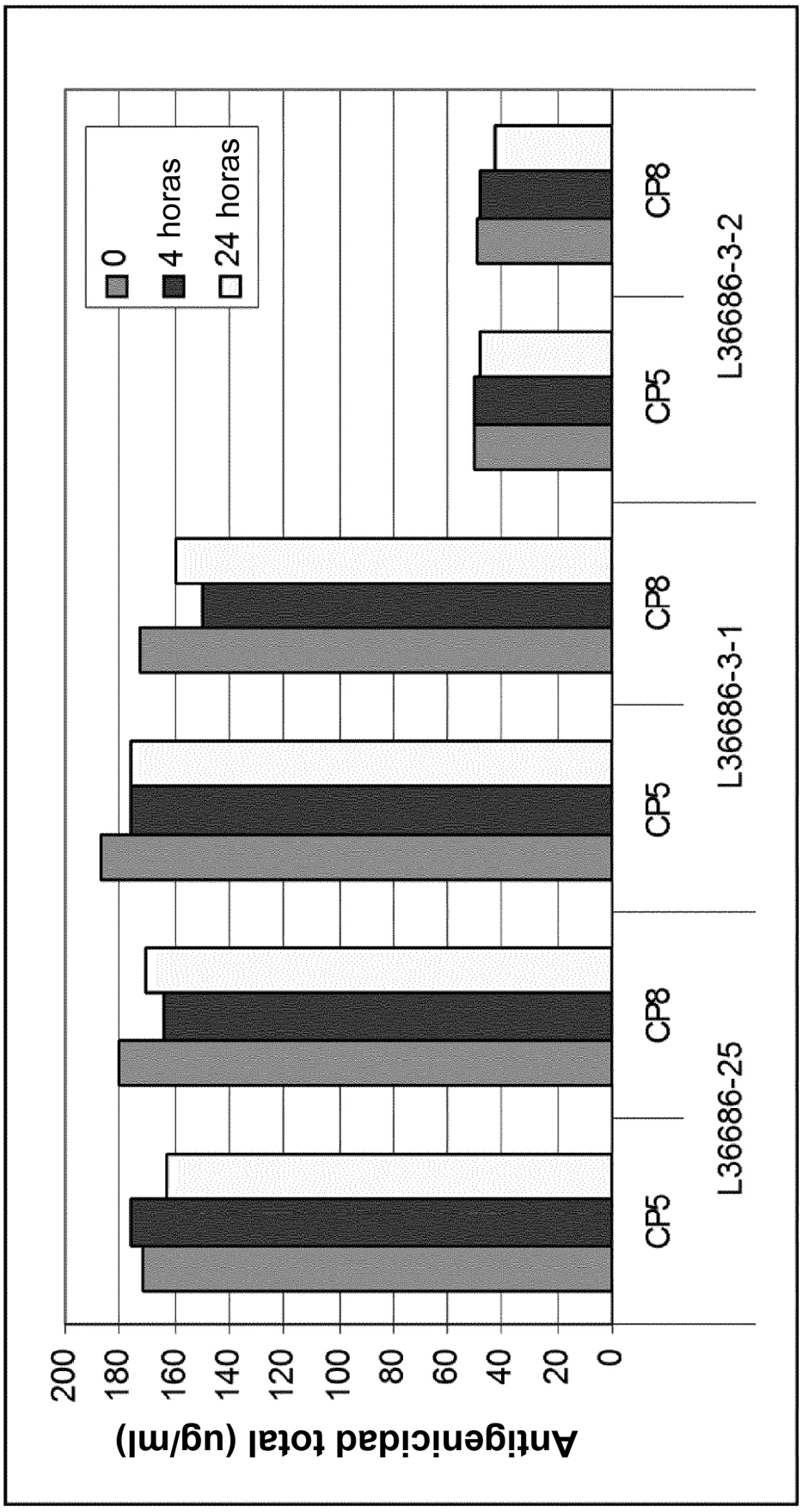

Antigenicidad total (ug/ml)
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
4 horas
24 horas
CP5
CP8
L36686-25
CP5
CP8
L36686-3-1
CP5
CP8
L36686-3-2

FIGURA 11A

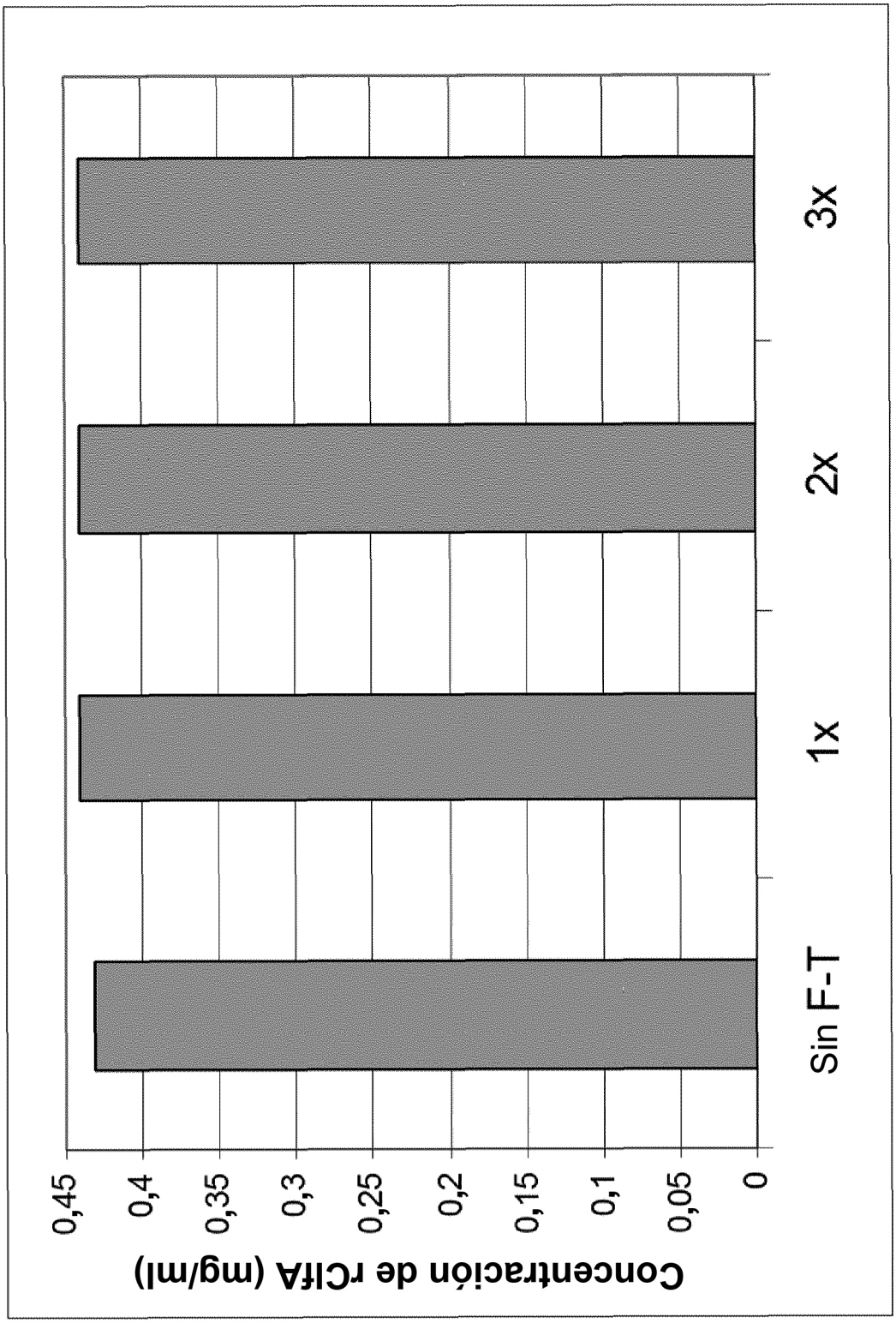

Concentración de rCIfA (mg/ml)
0,45
0,4
0,35
0,3
0,25
0,2
0,15
0,1
0,05
0
Sin F-T
1x
2x
3x

FIGURA 11B

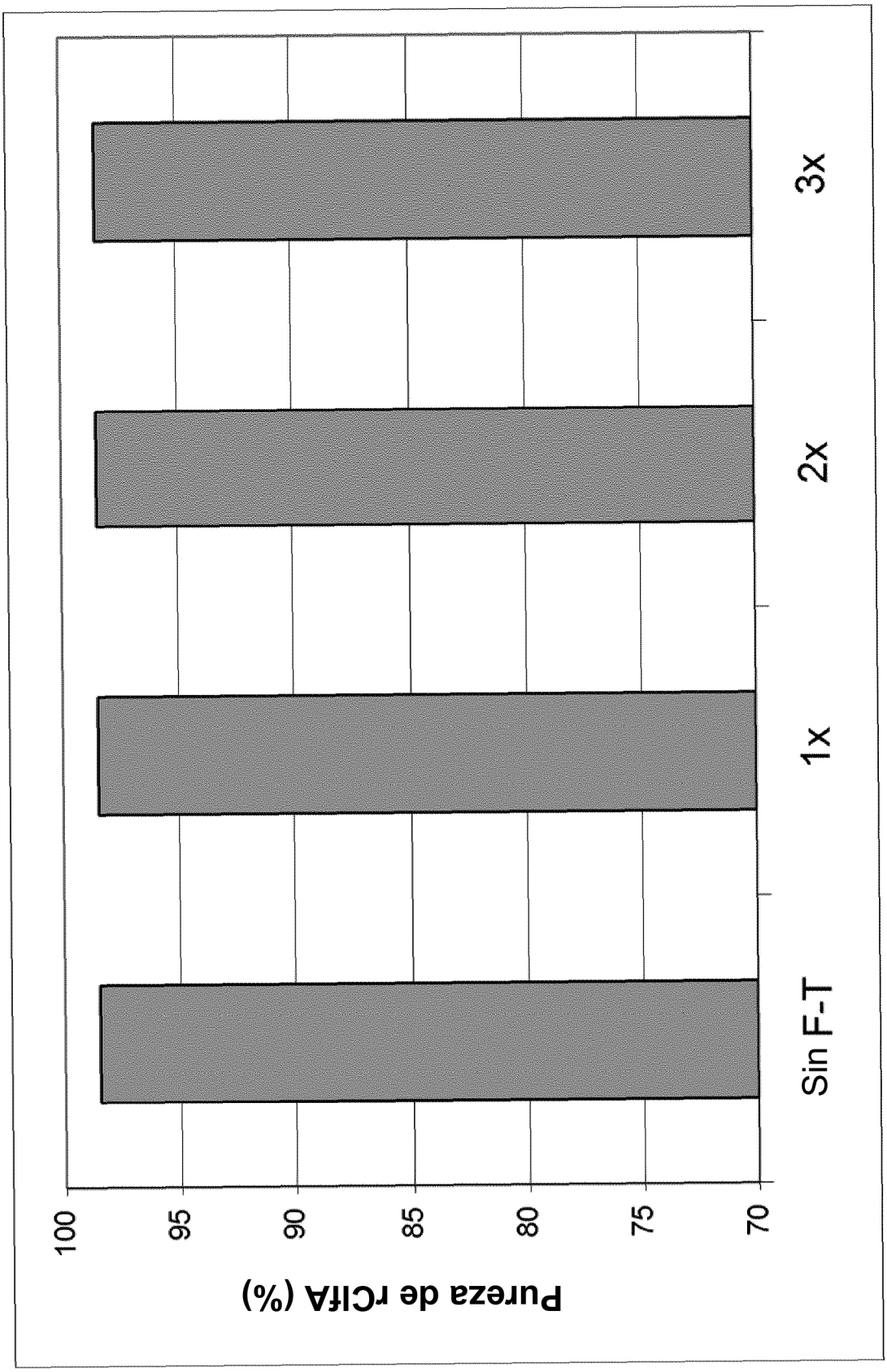


FIGURA 11C

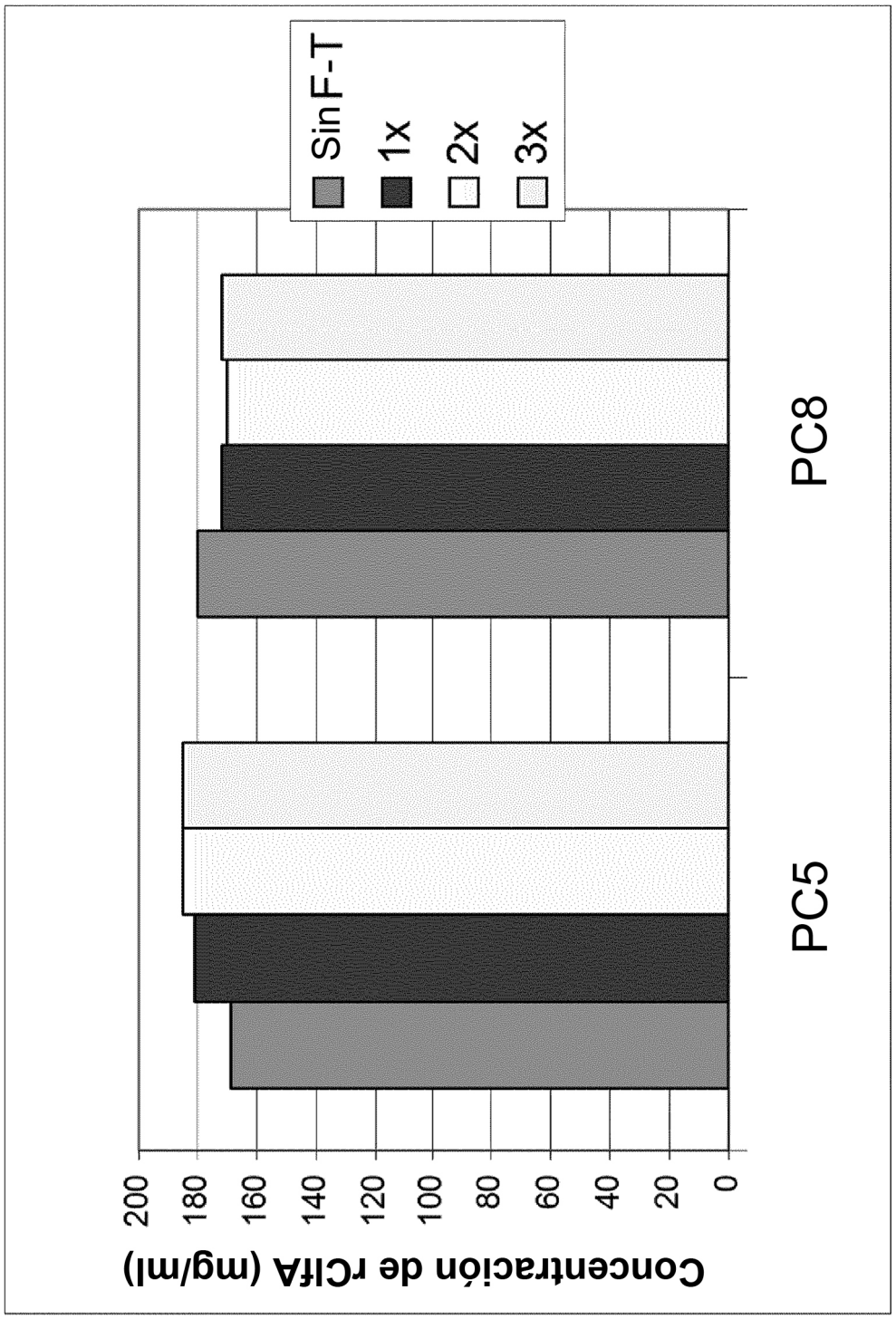

Sin F-T
1x
2x
3x
Concentración de rCIfA (mg/ml)
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
PC5
PC8

FIGURA 12A

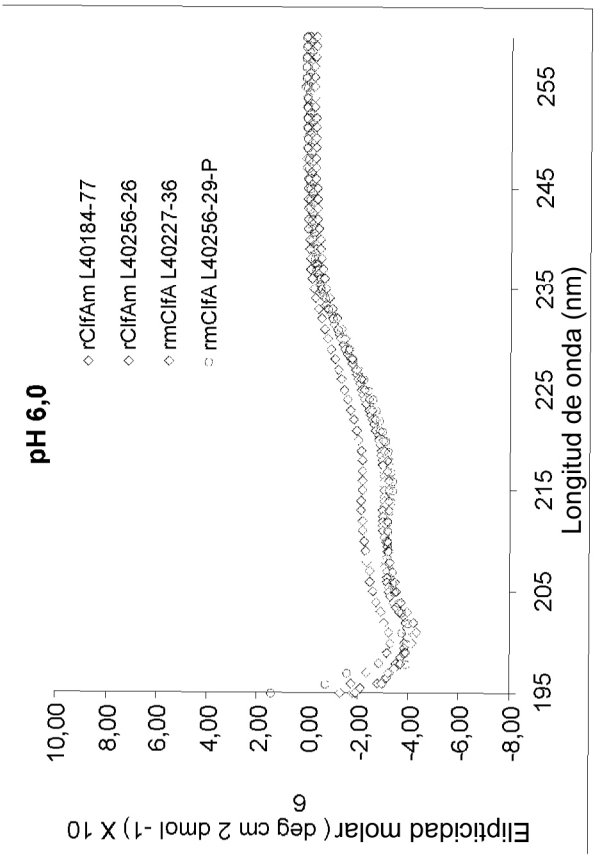


FIGURA 12B

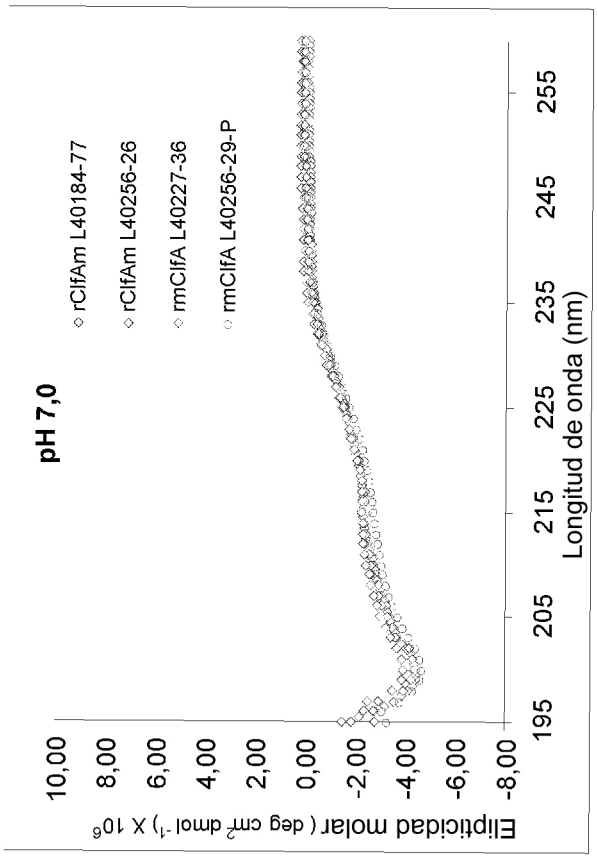


FIGURA 13

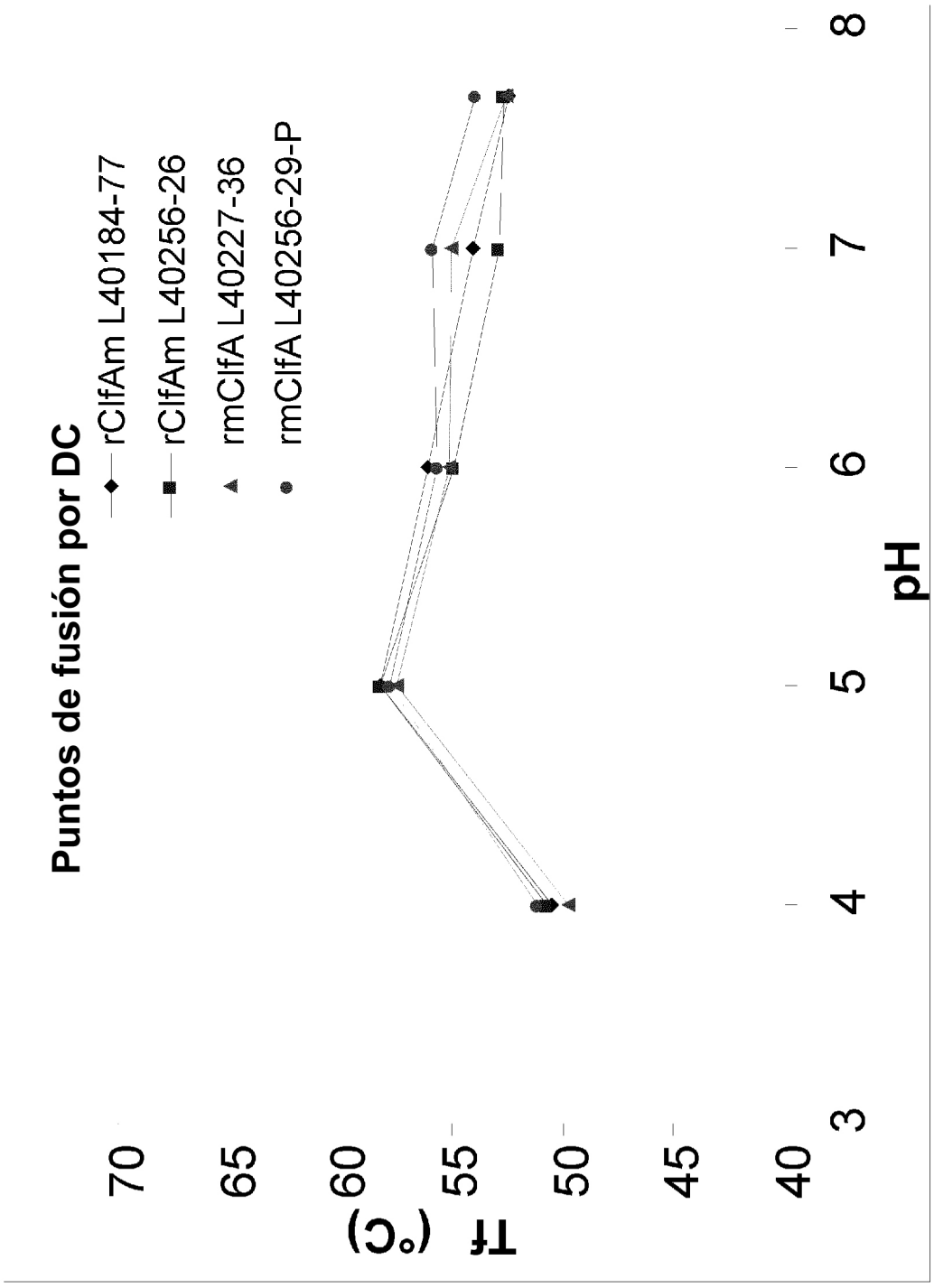

Puntos de fusión por DC
rClfAm L40184-77
rClfAm L40256-26
rmClfA L40227-36
rmClfA L40256-29-P
Tf (°C)
70
65
60
55
50
45
40
3
4
5
6
7
8
pH

FIGURA 14A

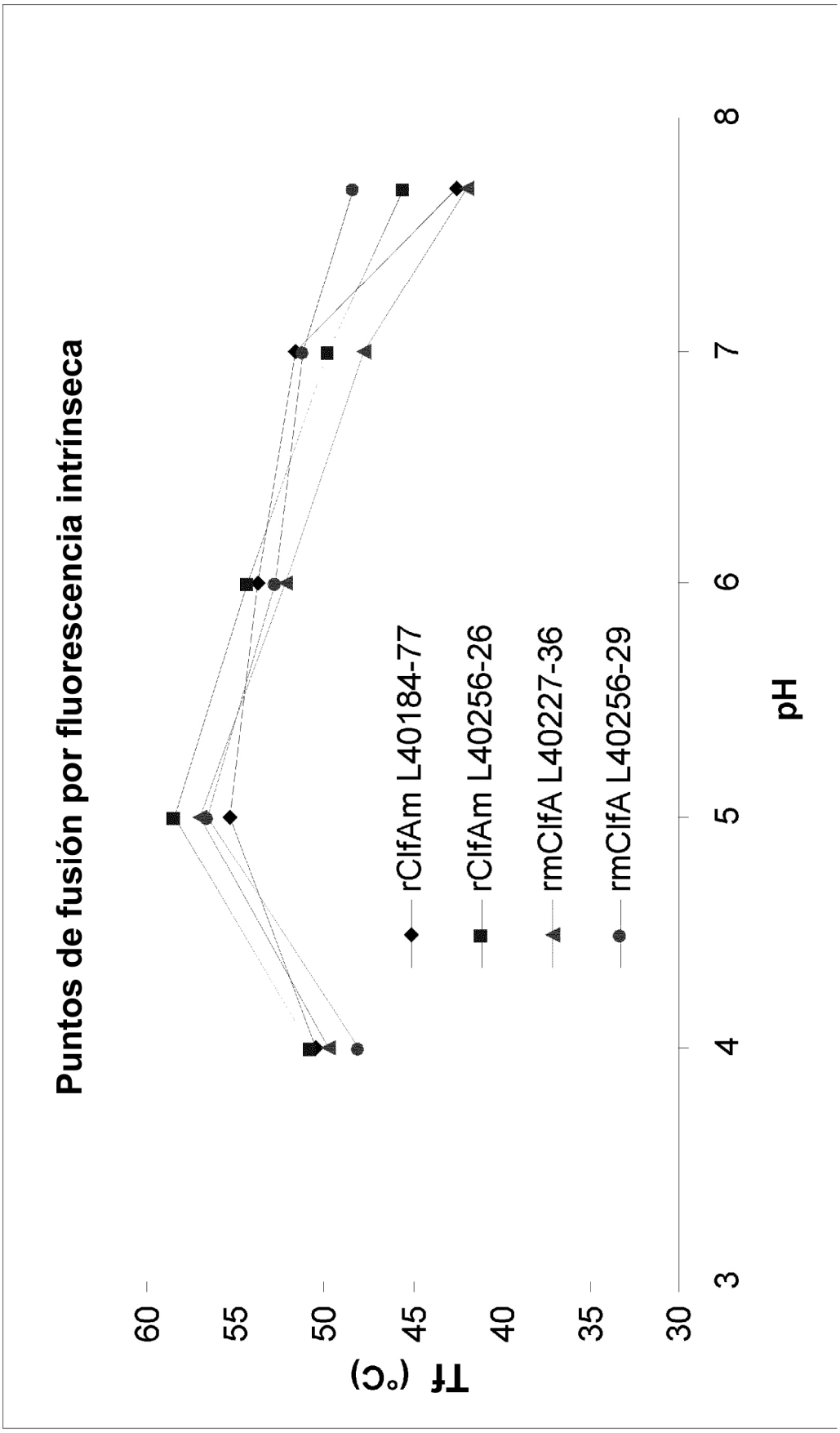

Puntos de fusión por fluorescencia intrínseca
Tf (°C)
pH
60
55
50
45
40
35
30
3
4
5
6
7
8
rClfAm L40184-77
rClfAm L40256-26
rmClfA L40227-36
rmClfA L40256-29

FIGURA 14B

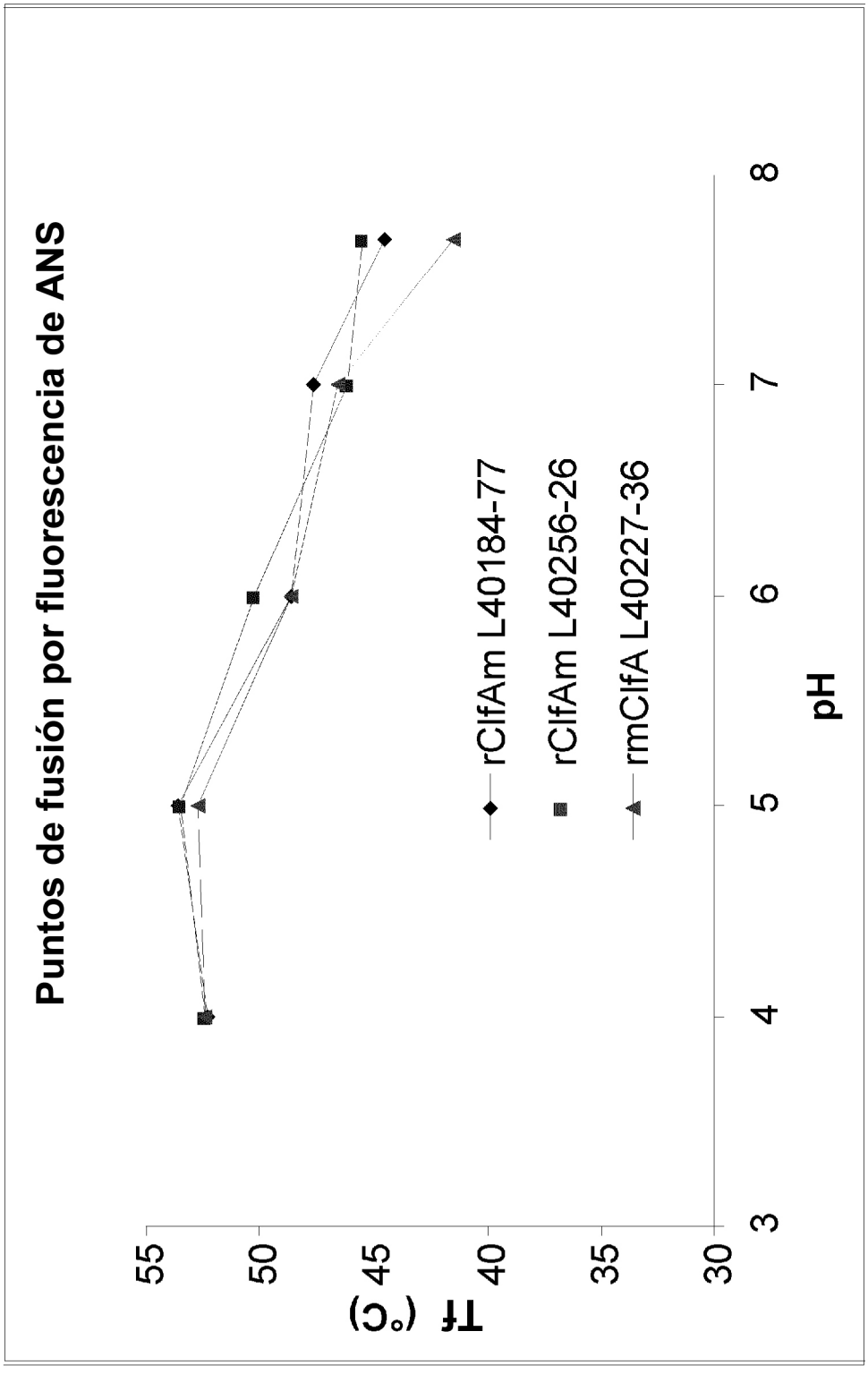

Puntos de fusión por fluorescencia de ANS
Tf (°C)
55
50
45
40
35
30
3
4
5
6
7
8
pH
rClfAm L40184-77
rClfAm L40256-26
rmClfA L40227-36

FIGURA 15

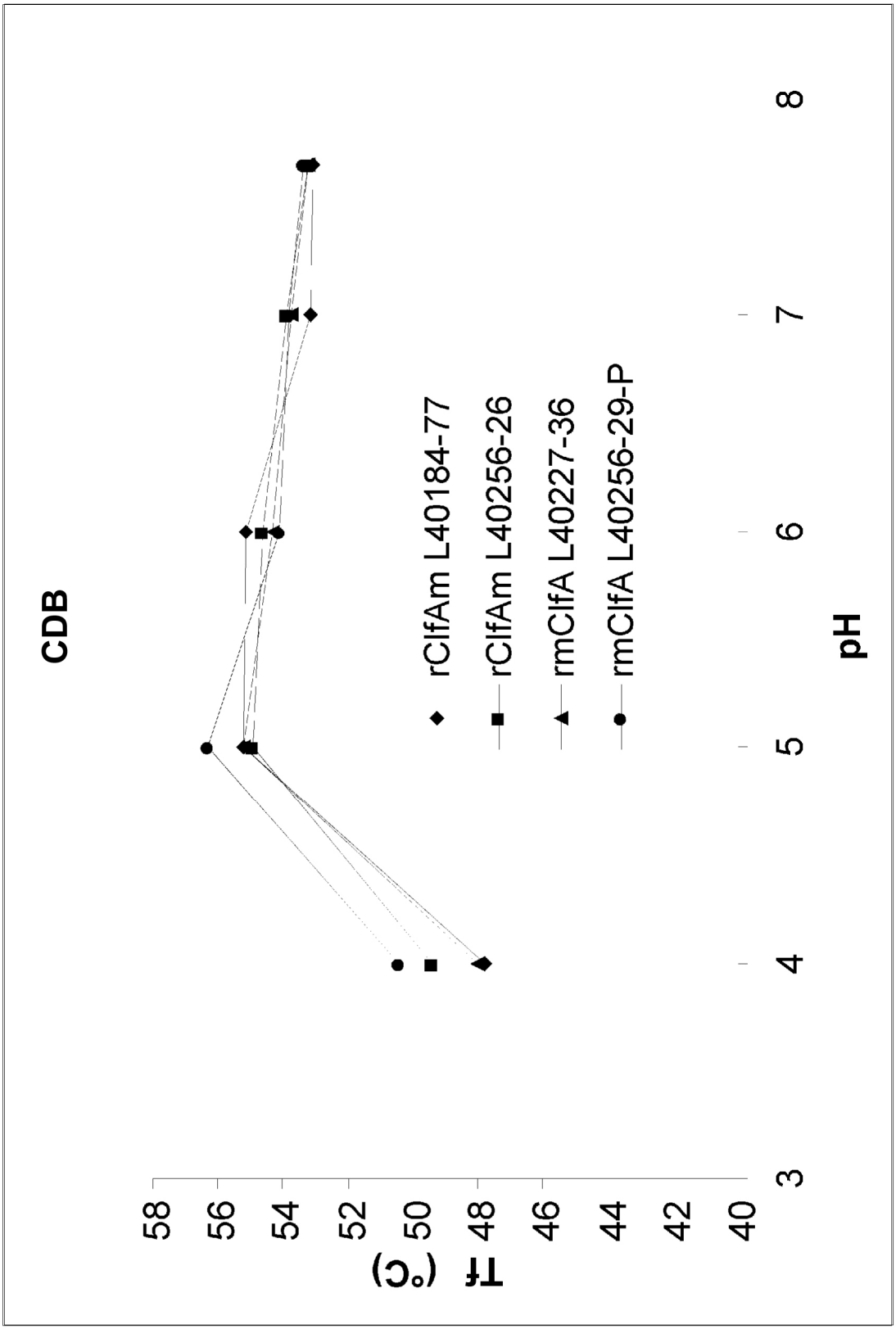

CDB
Tf (°C)
58
56
54
52
50
48
46
44
42
40
3
4
5
6
7
8
pH
rClfAm L40184-77
rClfAm L40256-26
rmClfA L40227-36
rmClfA L40256-29-P

FIGURA 16

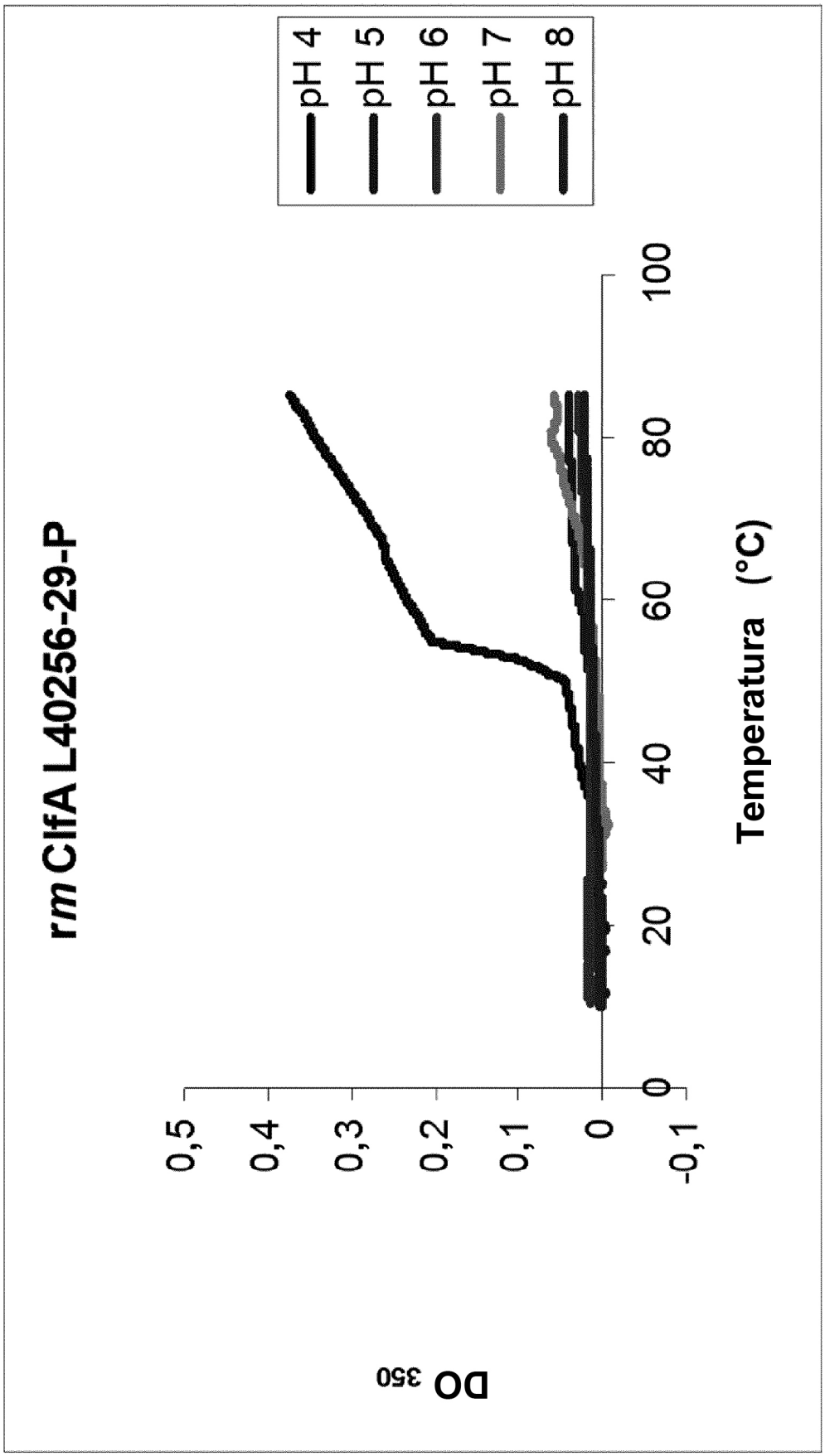

rm ClfA L40256-29-P
DO 350
Temperatura (°C)
pH 4
pH 5
pH 6
pH 7
pH 8
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
-0,1
0
20
40
60
80
100

FIGURA 17A

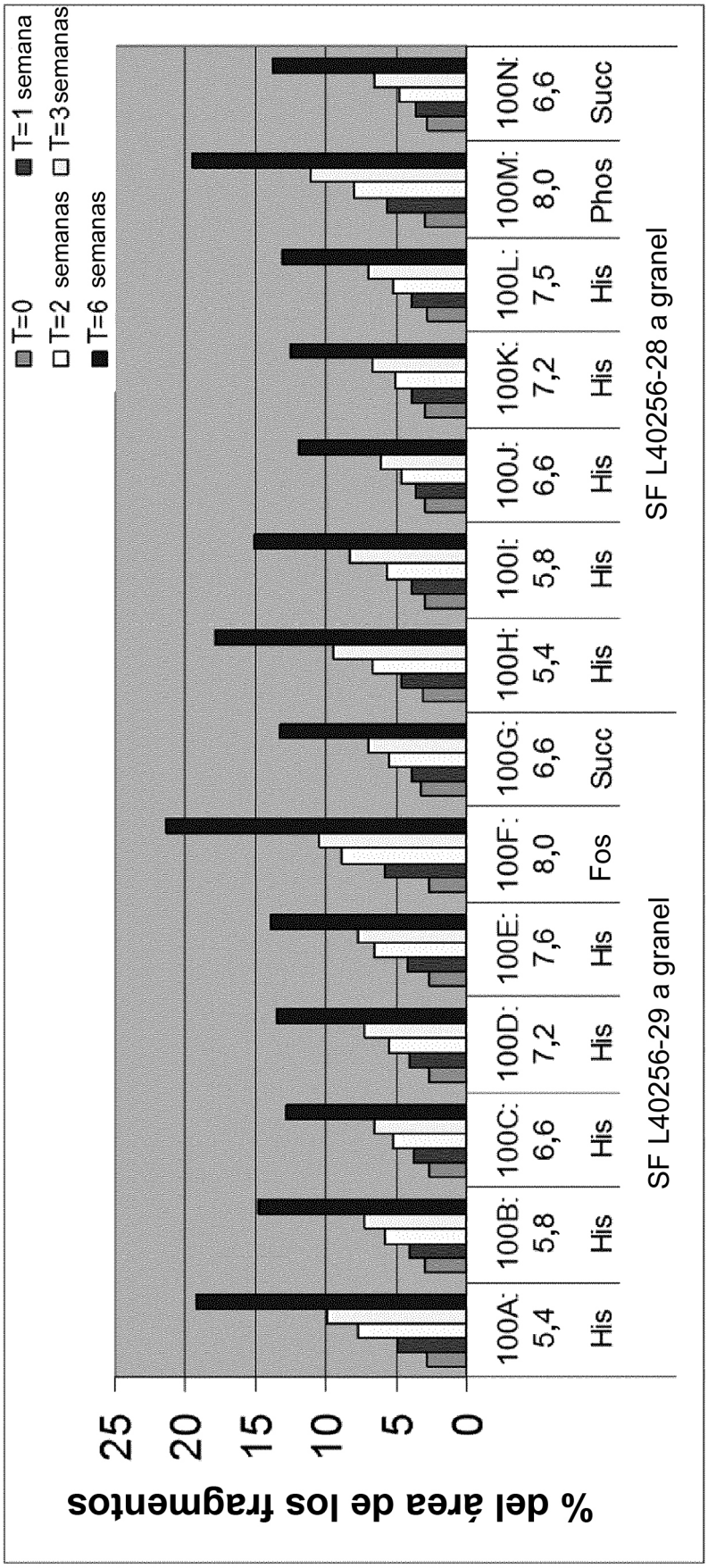

% del área de los fragmentos
25
20
15
10
5
0
T=0
T=1 semana
T=2 semanas
T=3semanas
T=6 semanas
100A: 5,4 His
100B: 5,8 His
100C: 6,6 His
100D: 7,2 His
100E: 7,6 His
100F: 8,0 Fos
100G: 6,6 Succ
100H: 5,4 His
100I: 5,8 His
100J: 6,6 His
100K: 7,2 His
100L: 7,5 His
100M: 8,0 Phos
100N: 6,6 Succ
SF L40256-29 a granel
SF L40256-28 a granel

FIGURA 17B **pH**

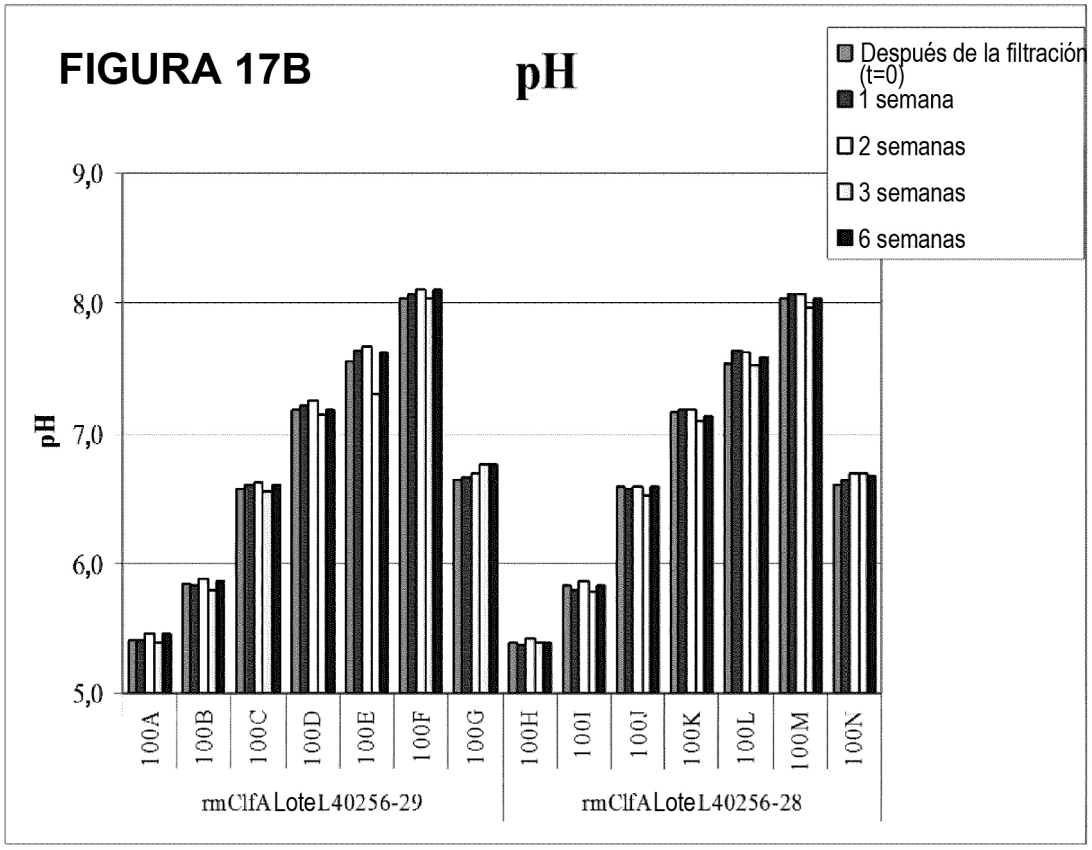


FIGURA 17C **DO_{350}**

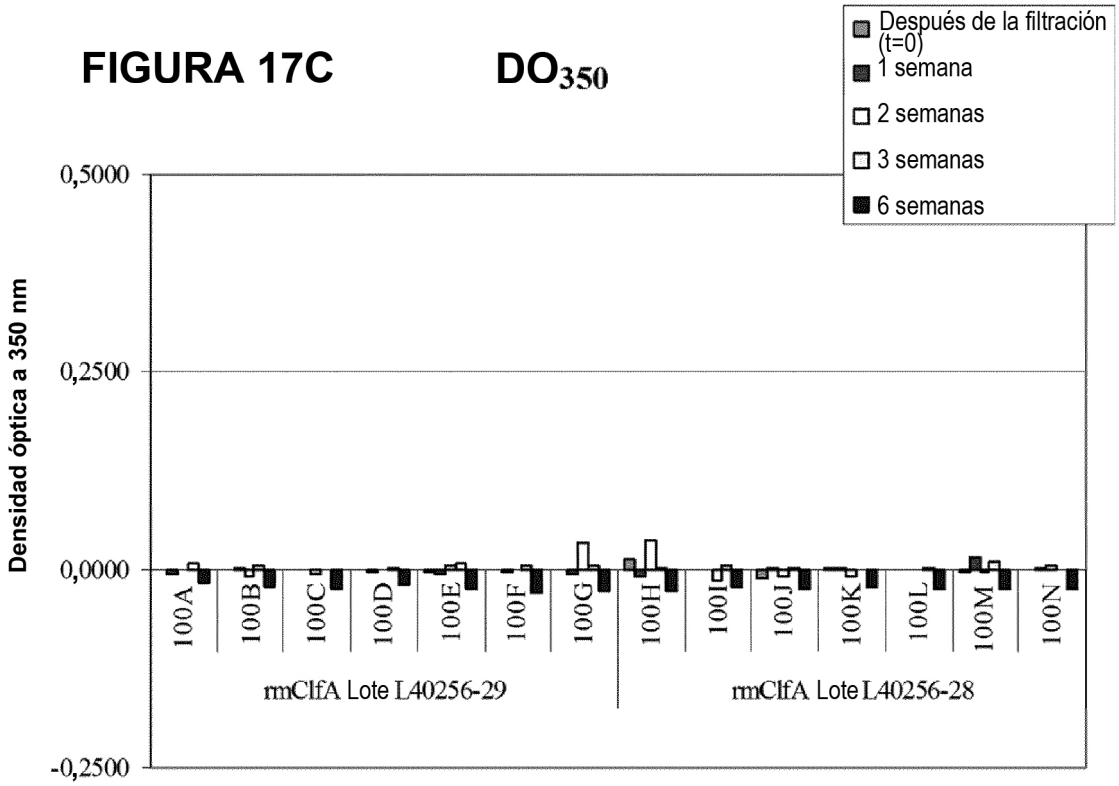


FIGURA 18A

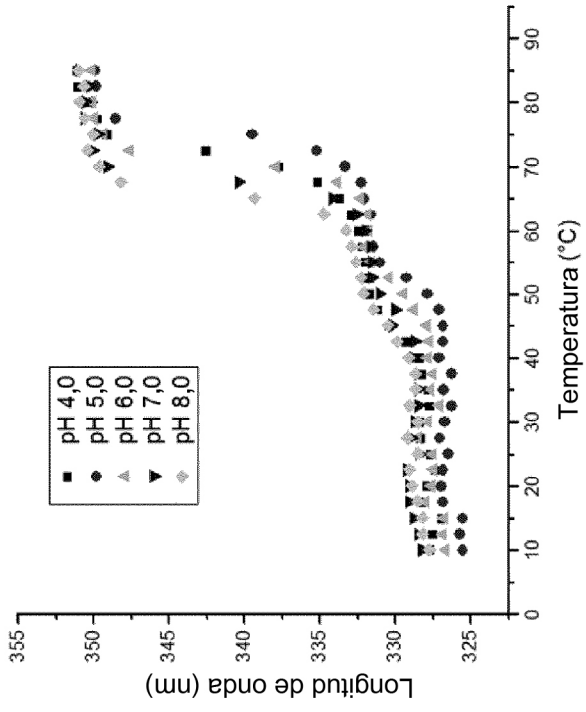


FIGURA 18B

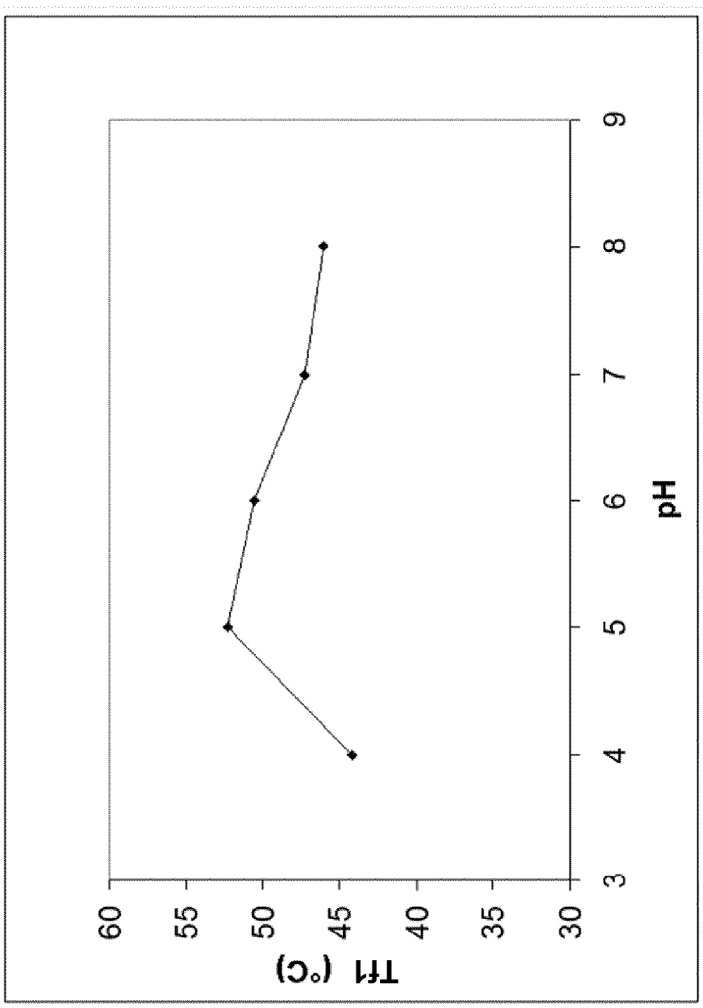


FIGURA 19A

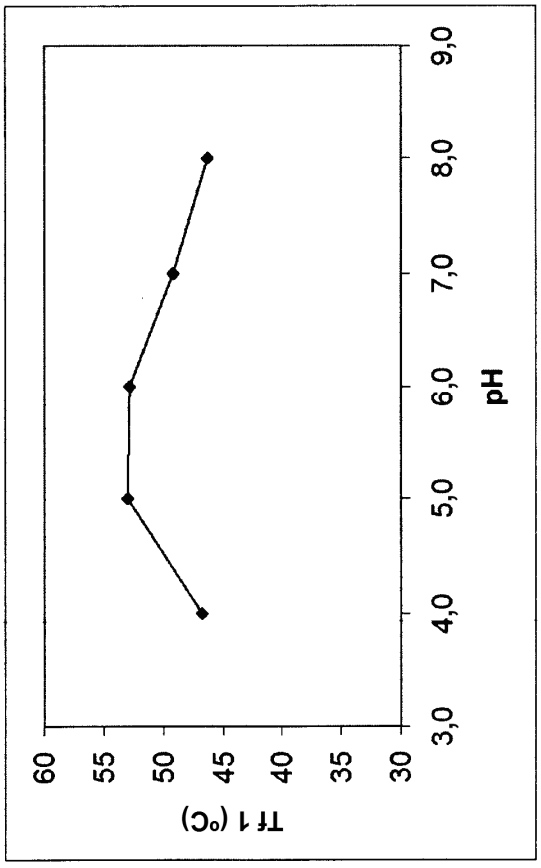


FIGURA 19B

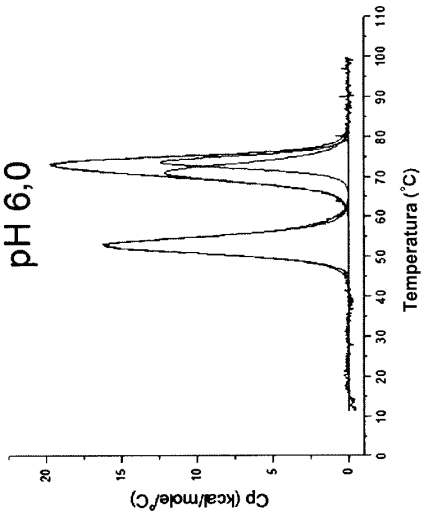


FIGURA 19C

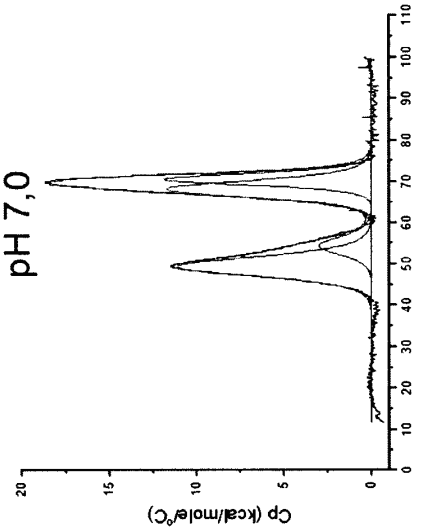


FIGURA 20

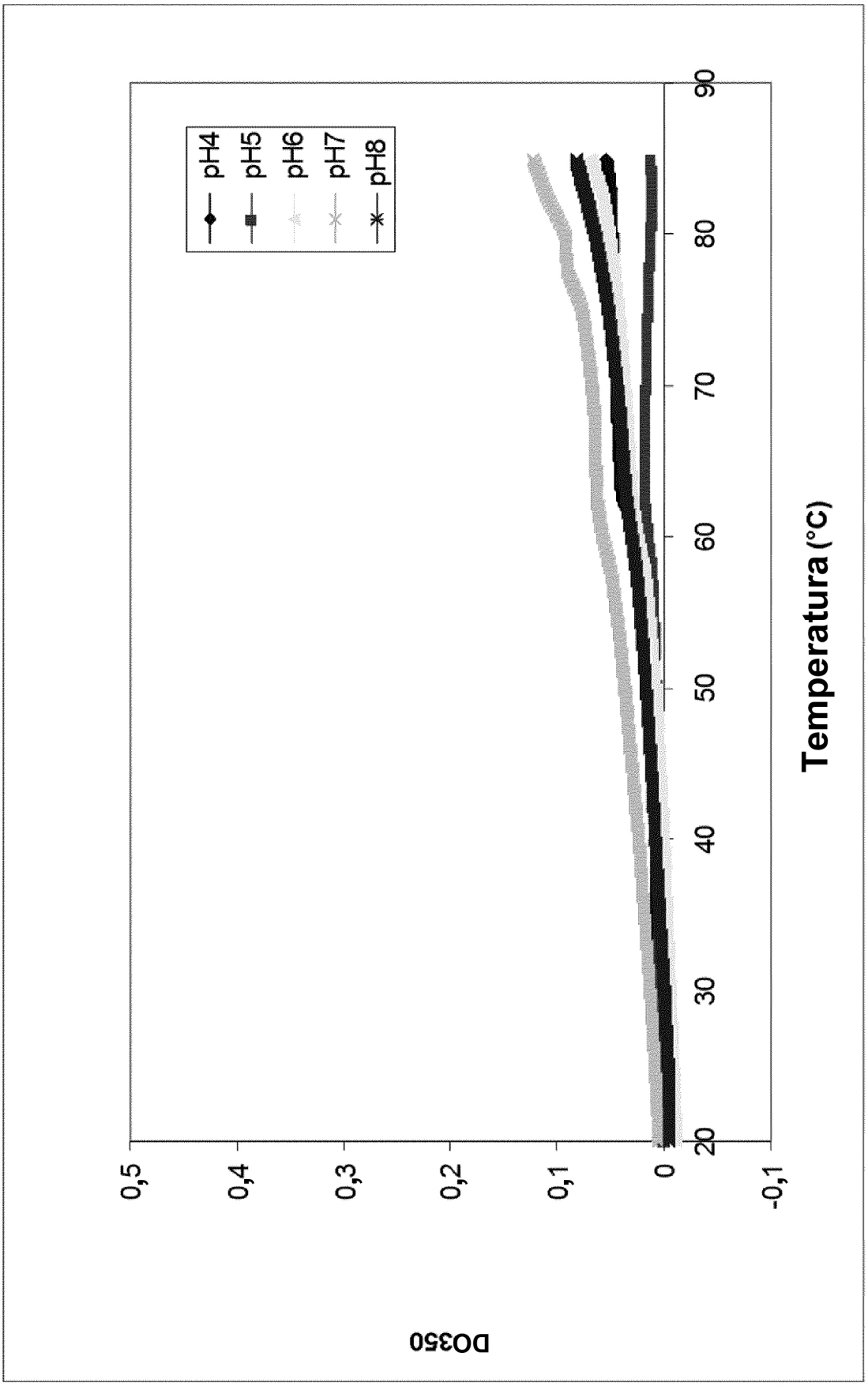

DO350
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
-0,1
20
30
40
50
60
70
80
90
Temperatura (°C)
pH4
pH5
pH6
pH7
pH8

FIGURA 21A

Cromatograma de FI-HPLC representativo de

r*m*ClfA (25°C)

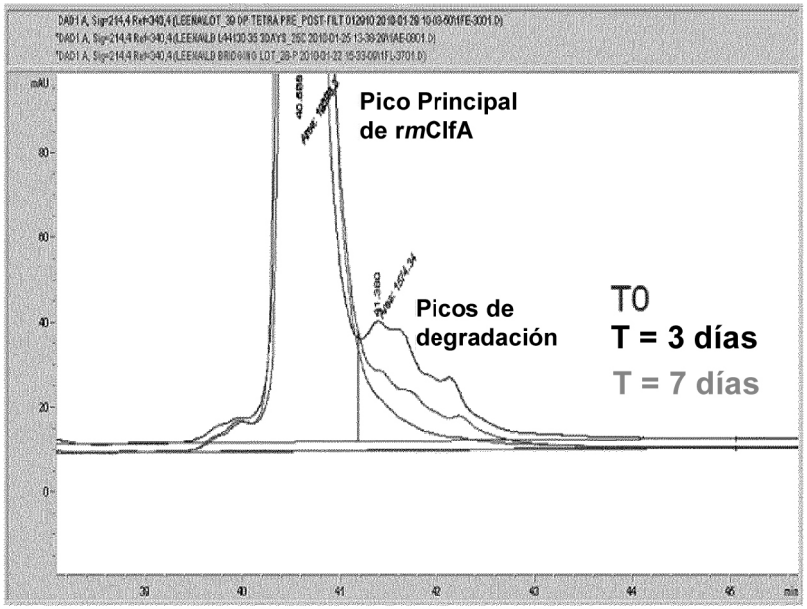


FIGURA 21B

Cromatograma de FI-HPLC representativo de

rP305A (25°C)

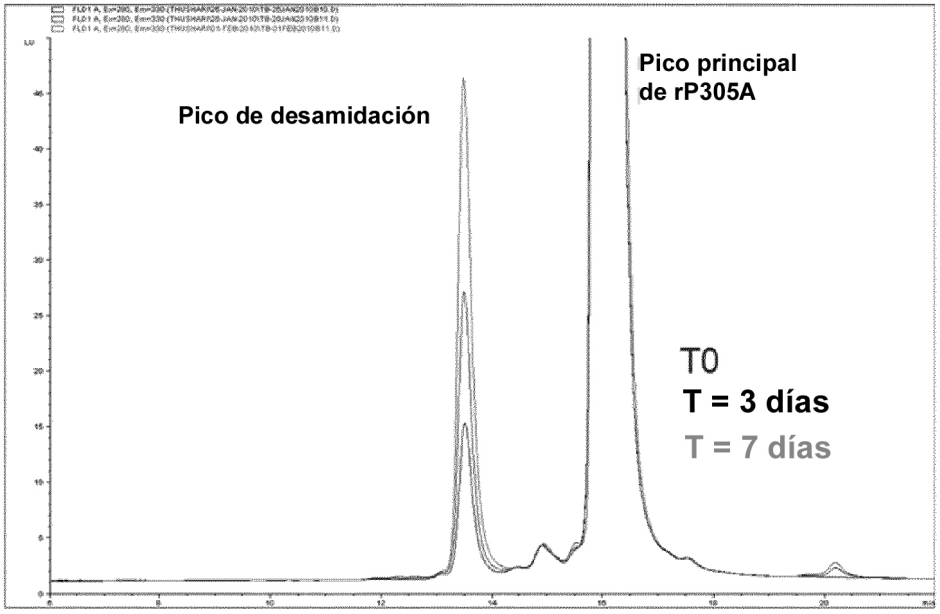


FIGURA 22B

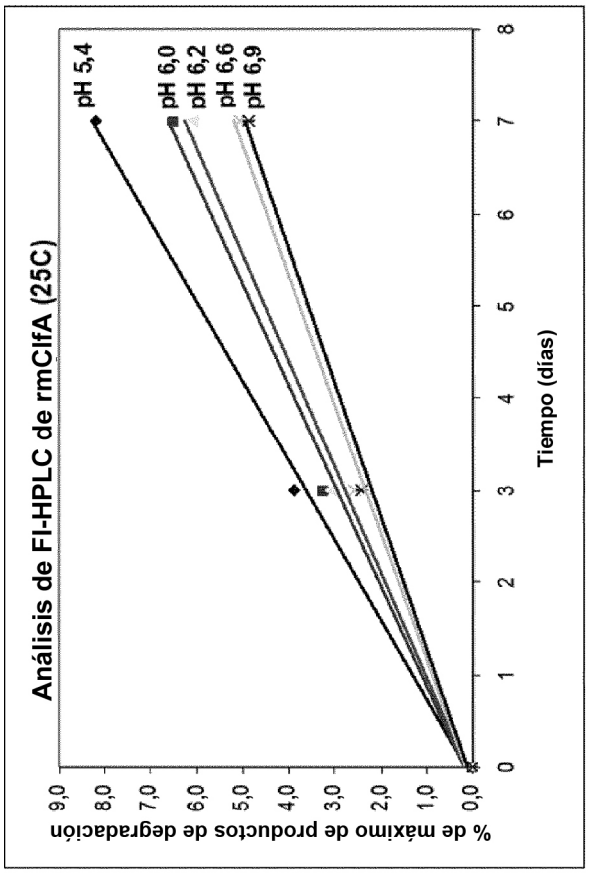


FIGURA 22A

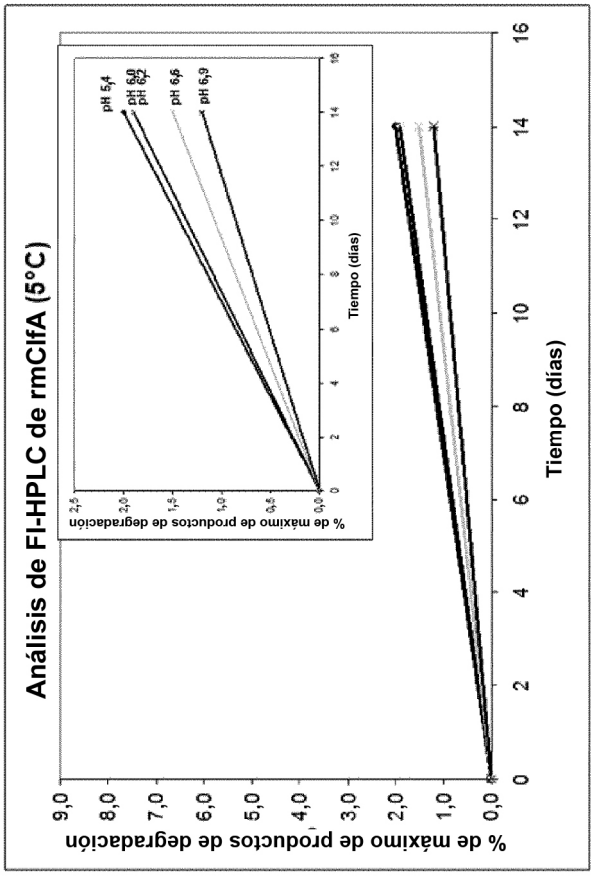


FIGURA 22C

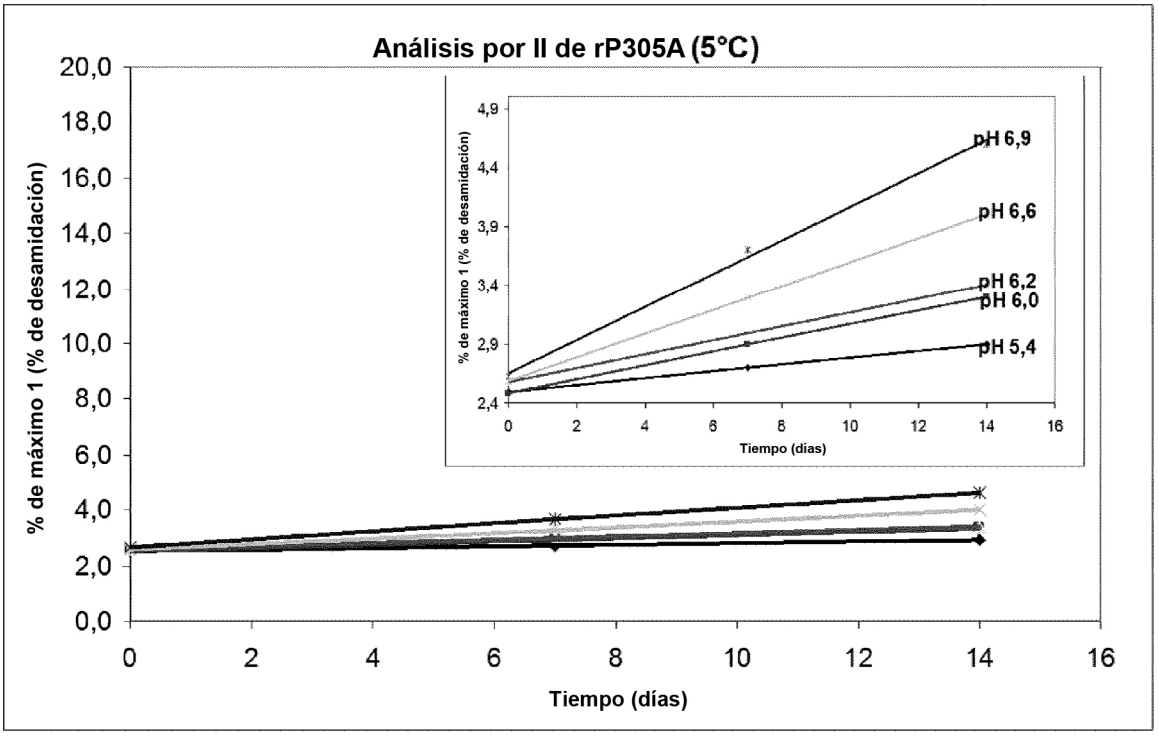


FIGURA 22D

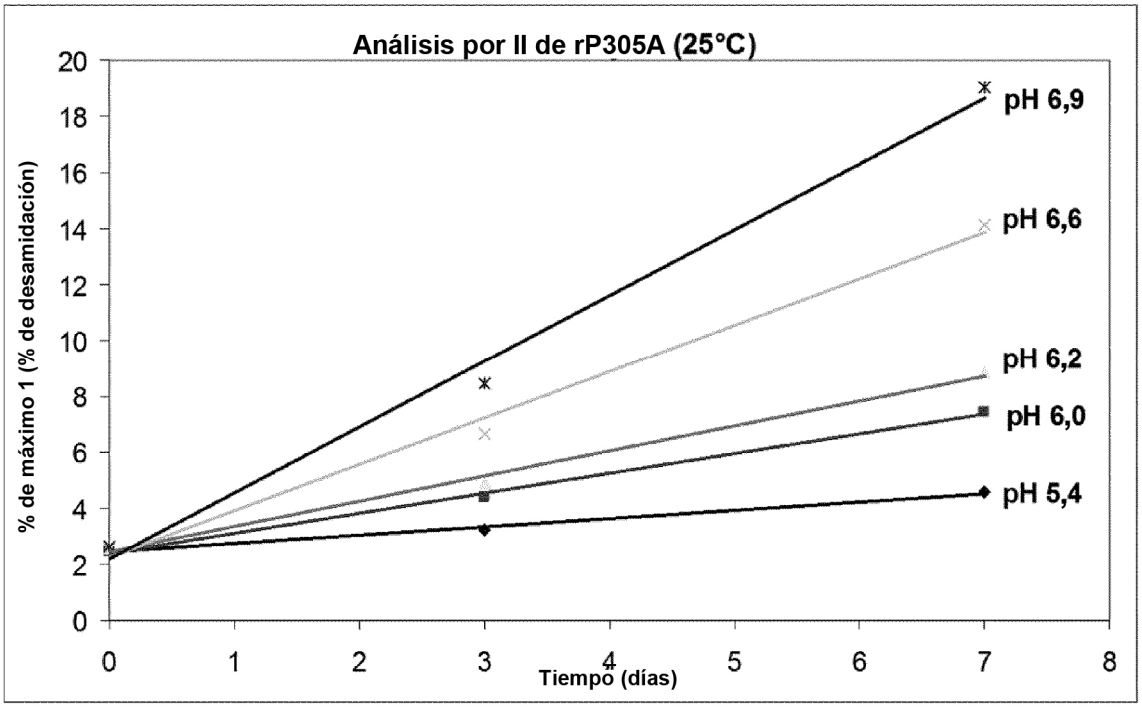


FIGURA 23A

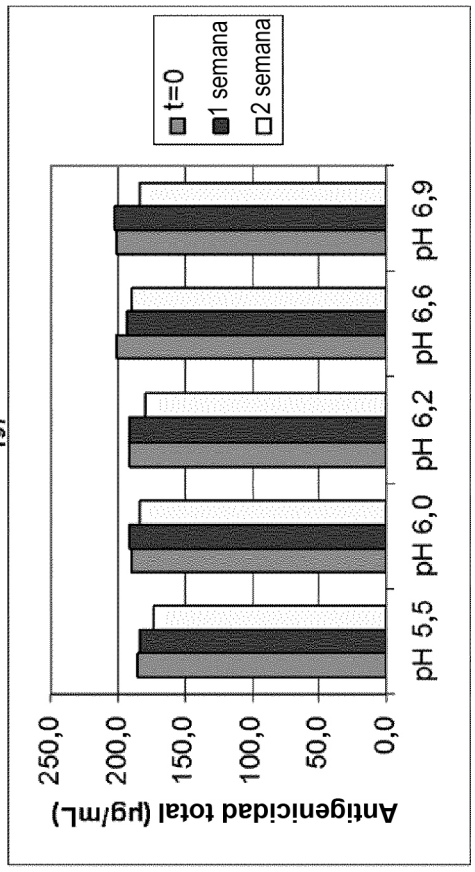


FIGURA 23B

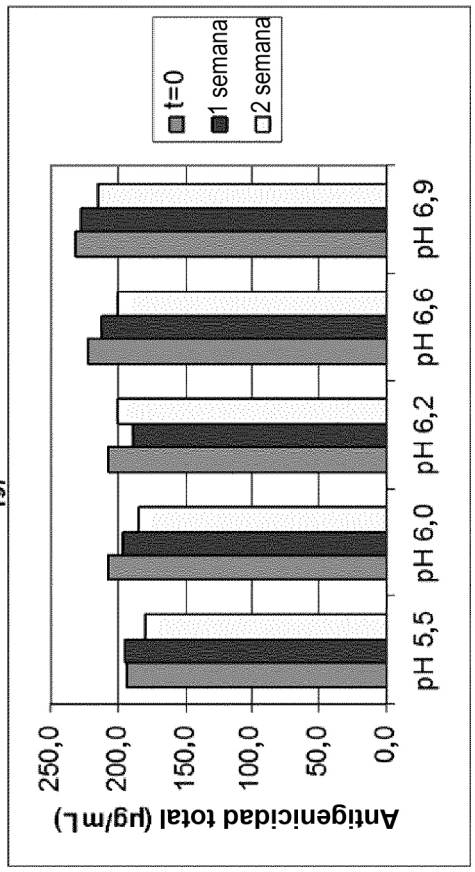


FIGURA 23C

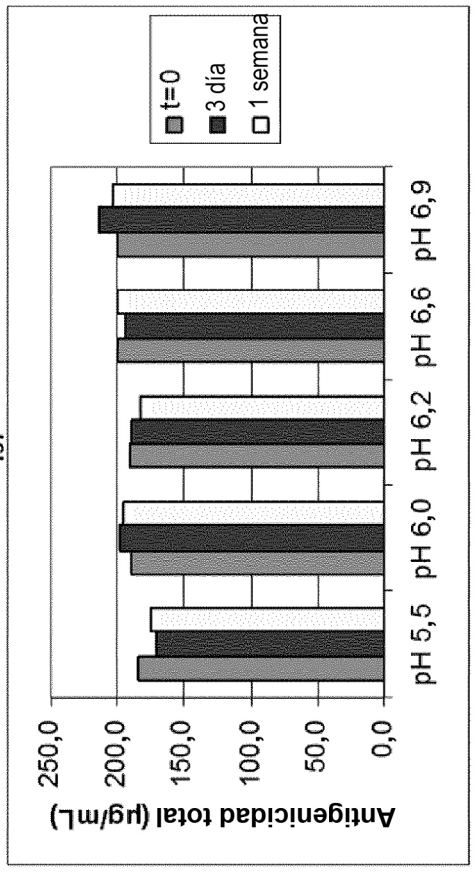


FIGURA 23D

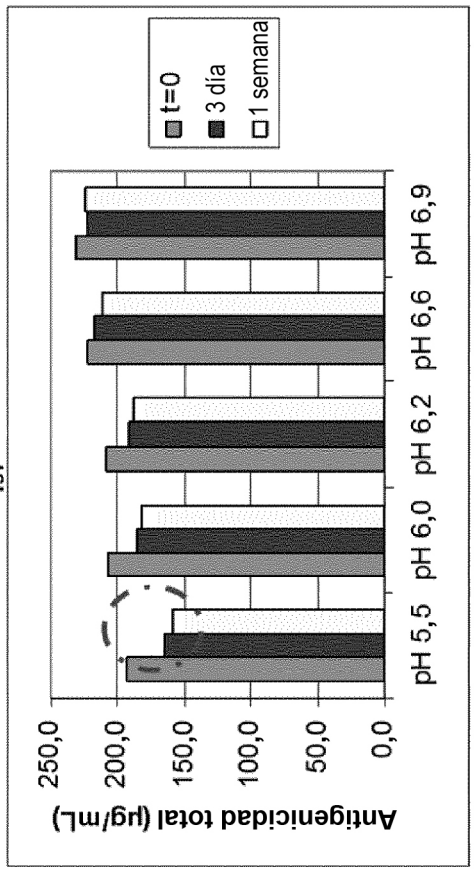


FIGURA 24A

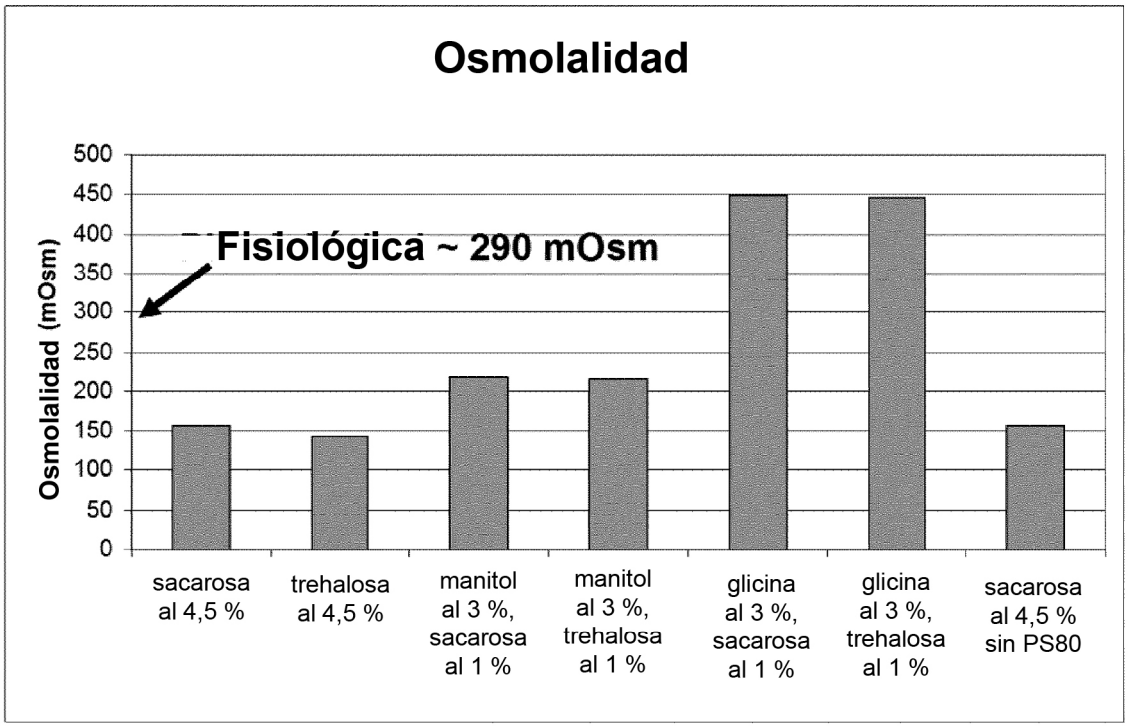


FIGURA 24B

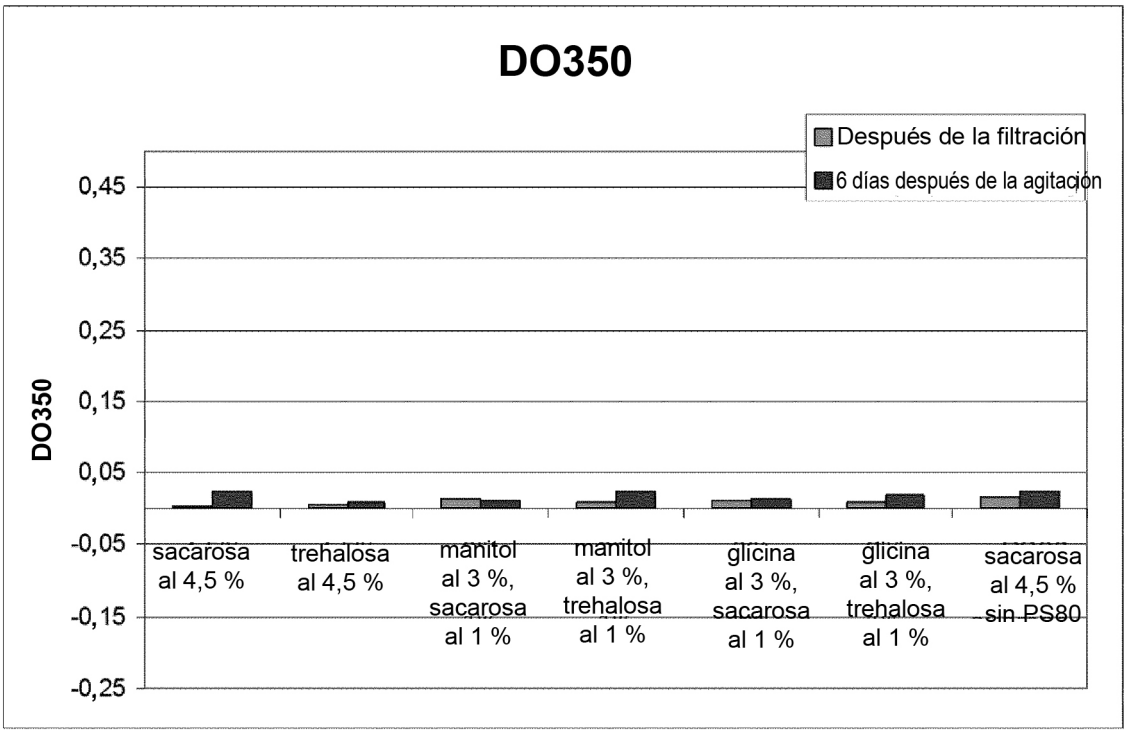
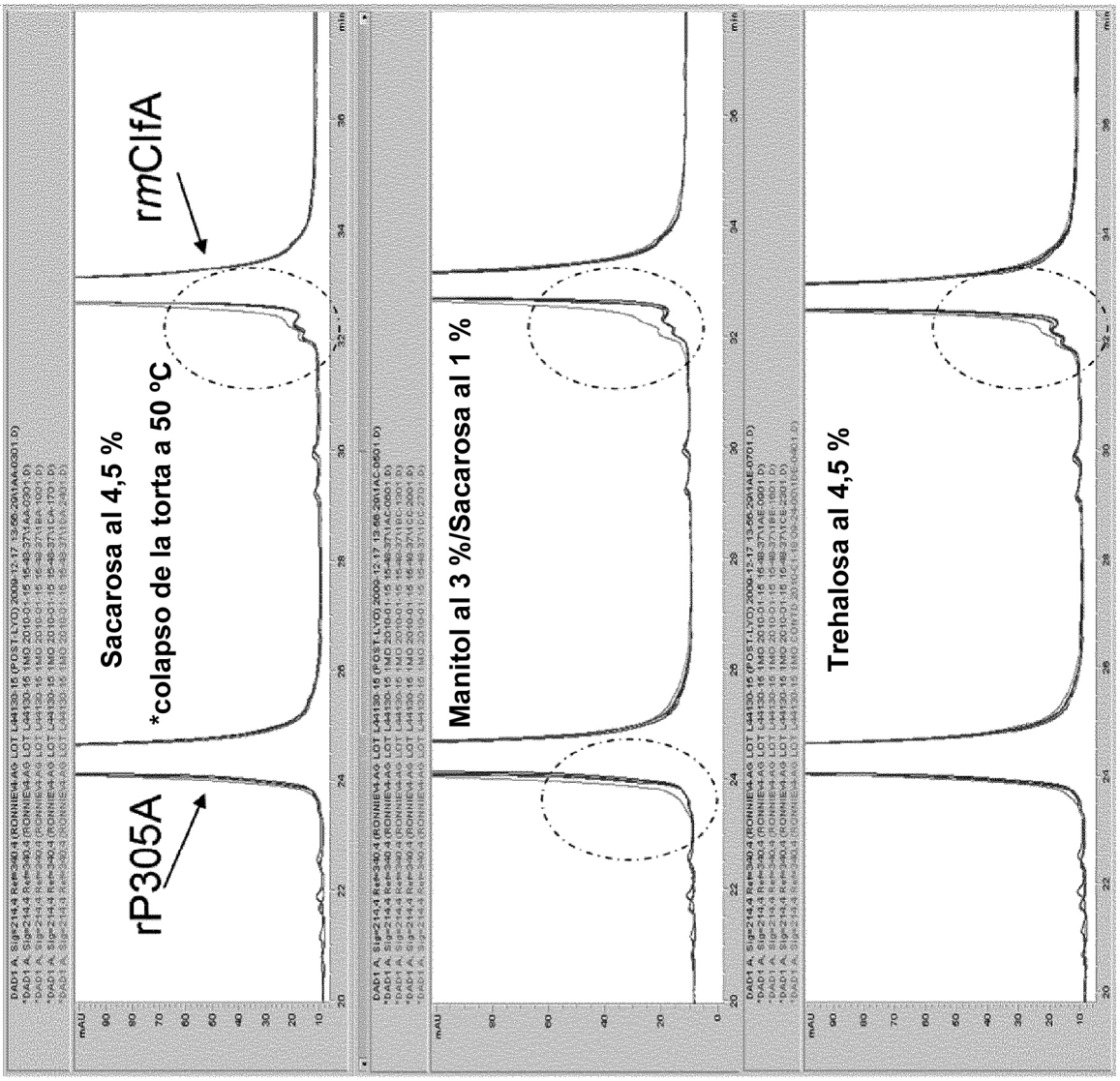


FIGURA 25A



t = 0
1 mes 5 ºC
1 mes 25 ºC
1 mes 37 ºC
1 mes 50 ºC

FIGURA 25B

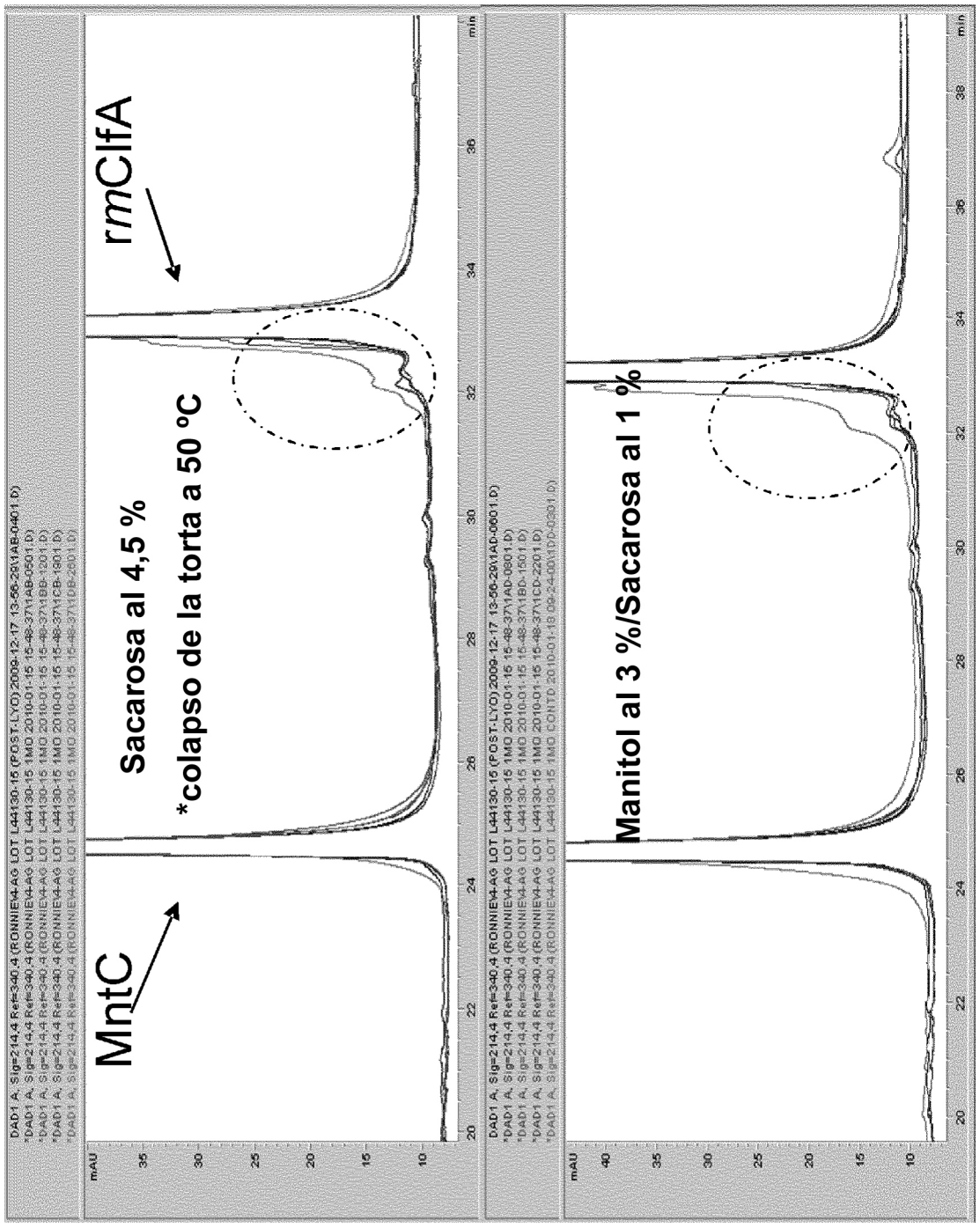

t = 0
1 mes 5 ºC
1 mes 25 ºC
1 mes 37 ºC
1 mes 50 ºC
MntC
rmClfA
Sacarosa al 4,5 %
*colapso de la torta a 50 ºC
Manitol al 3 %/Sacarosa al 1 %
mAU
min

FIGURA 25C

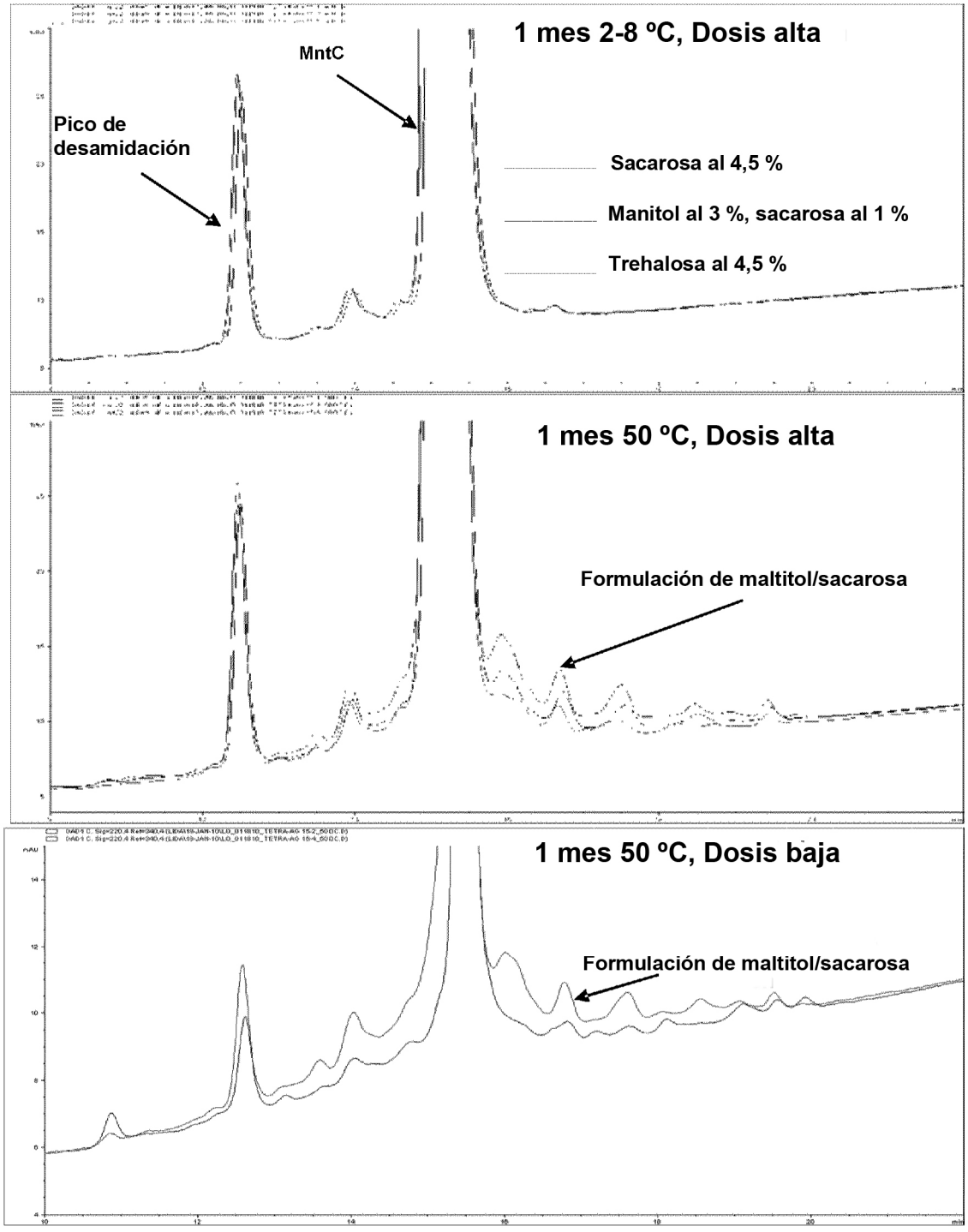

1 mes 2-8 ºC, Dosis alta
MntC
Pico de desamidación
Sacarosa al 4,5 %
Manitol al 3 %, sacarosa al 1 %
Trehalosa al 4,5 %
1 mes 50 ºC, Dosis alta
Formulación de maltitol/sacarosa
1 mes 50 ºC, Dosis baja
Formulación de maltitol/sacarosa

FIGURA 26A

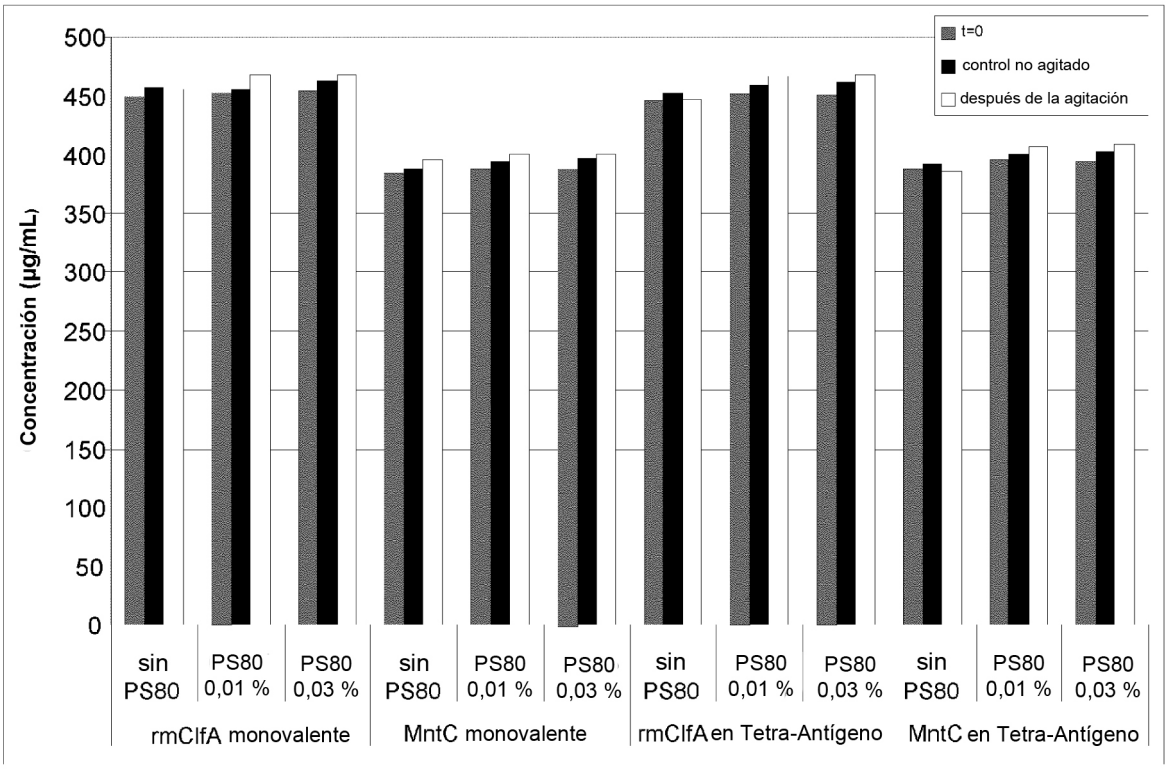


FIGURA 26B

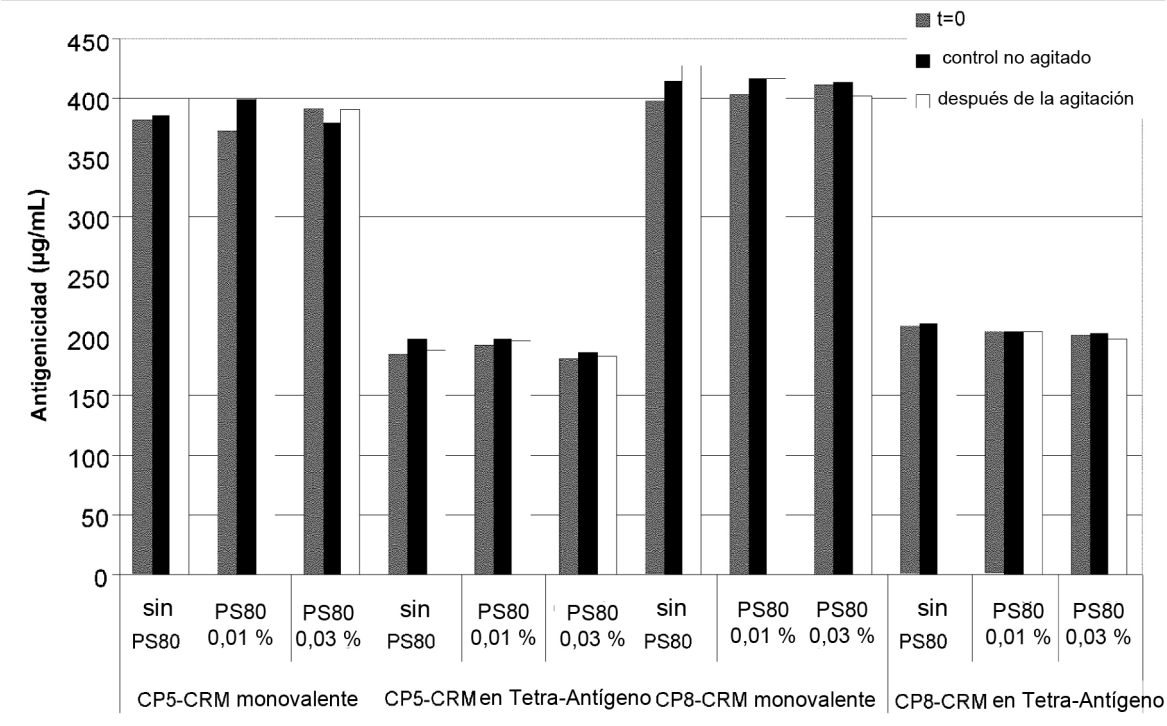


FIGURA 26C

Pureza de r*m* ClfA y MntC por FI-HPLC

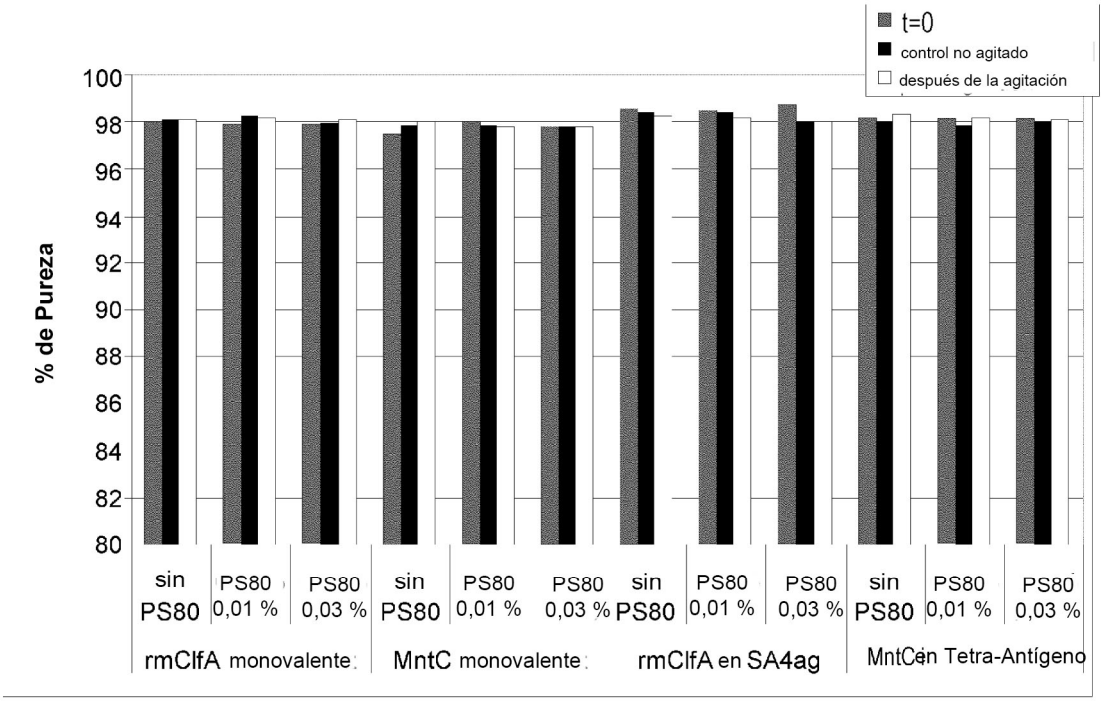


FIGURA 26D

Pureza de MntC por II-HPLC

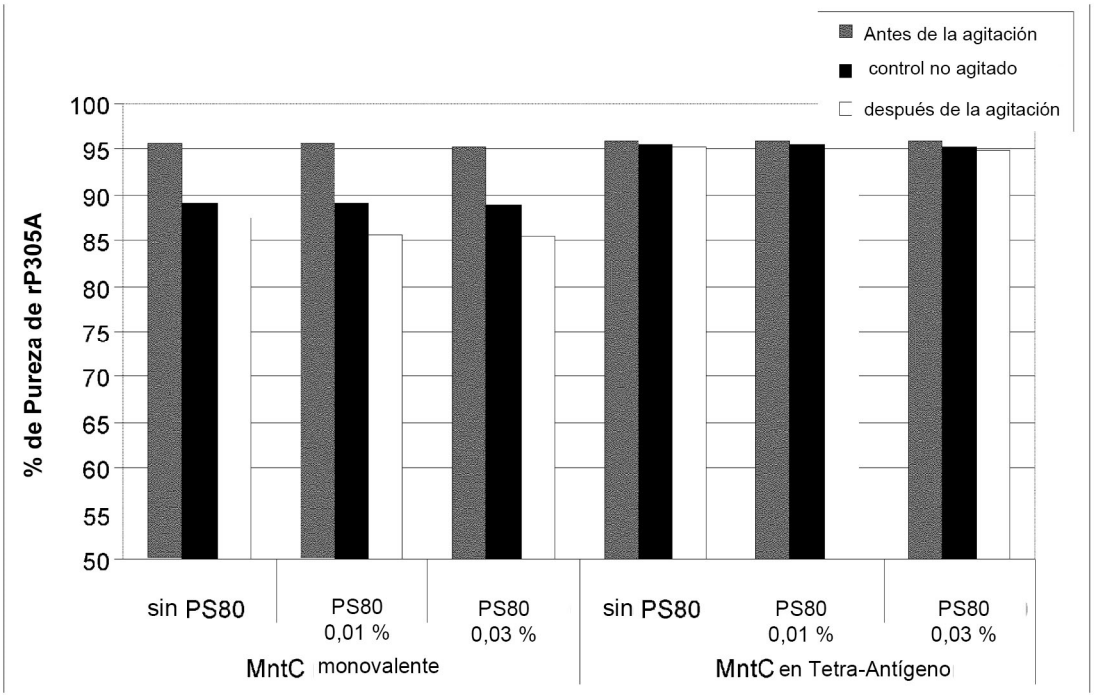


FIGURA 26E

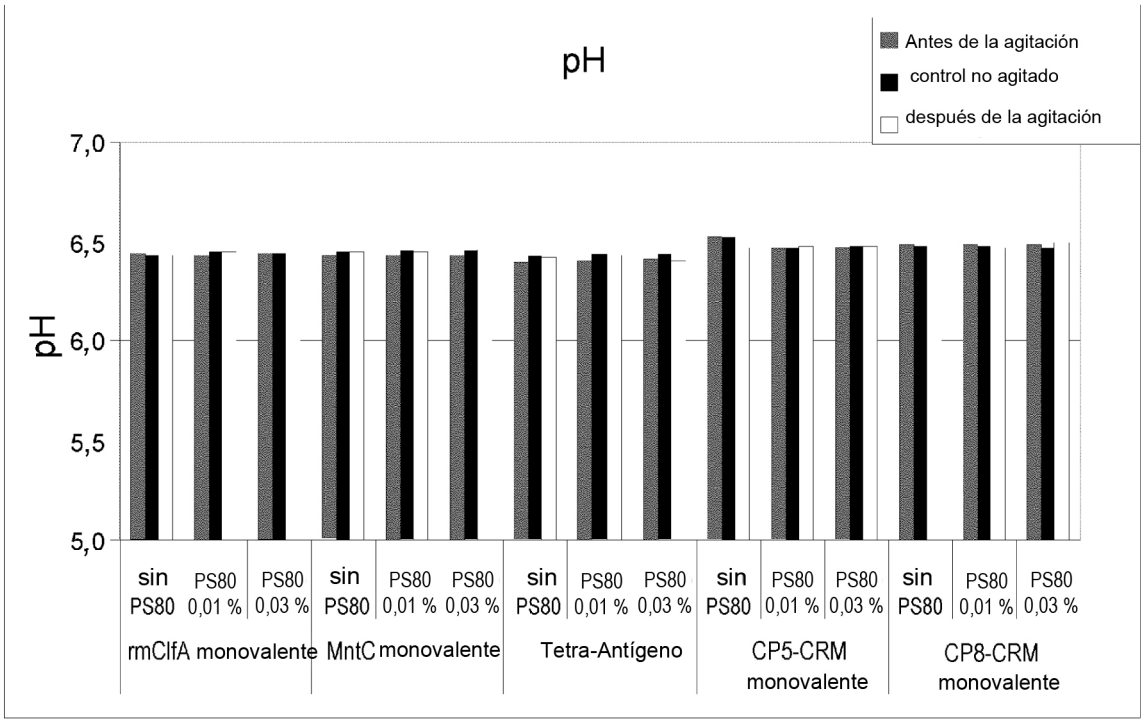


FIGURA 26F

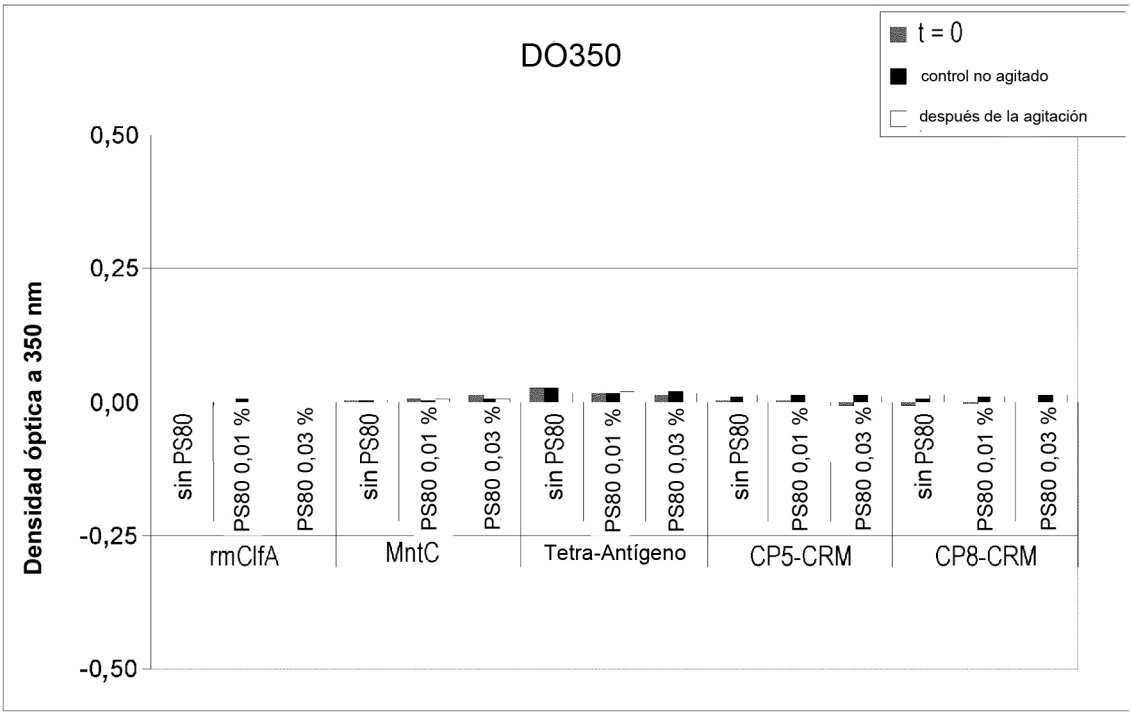


FIGURA 27A

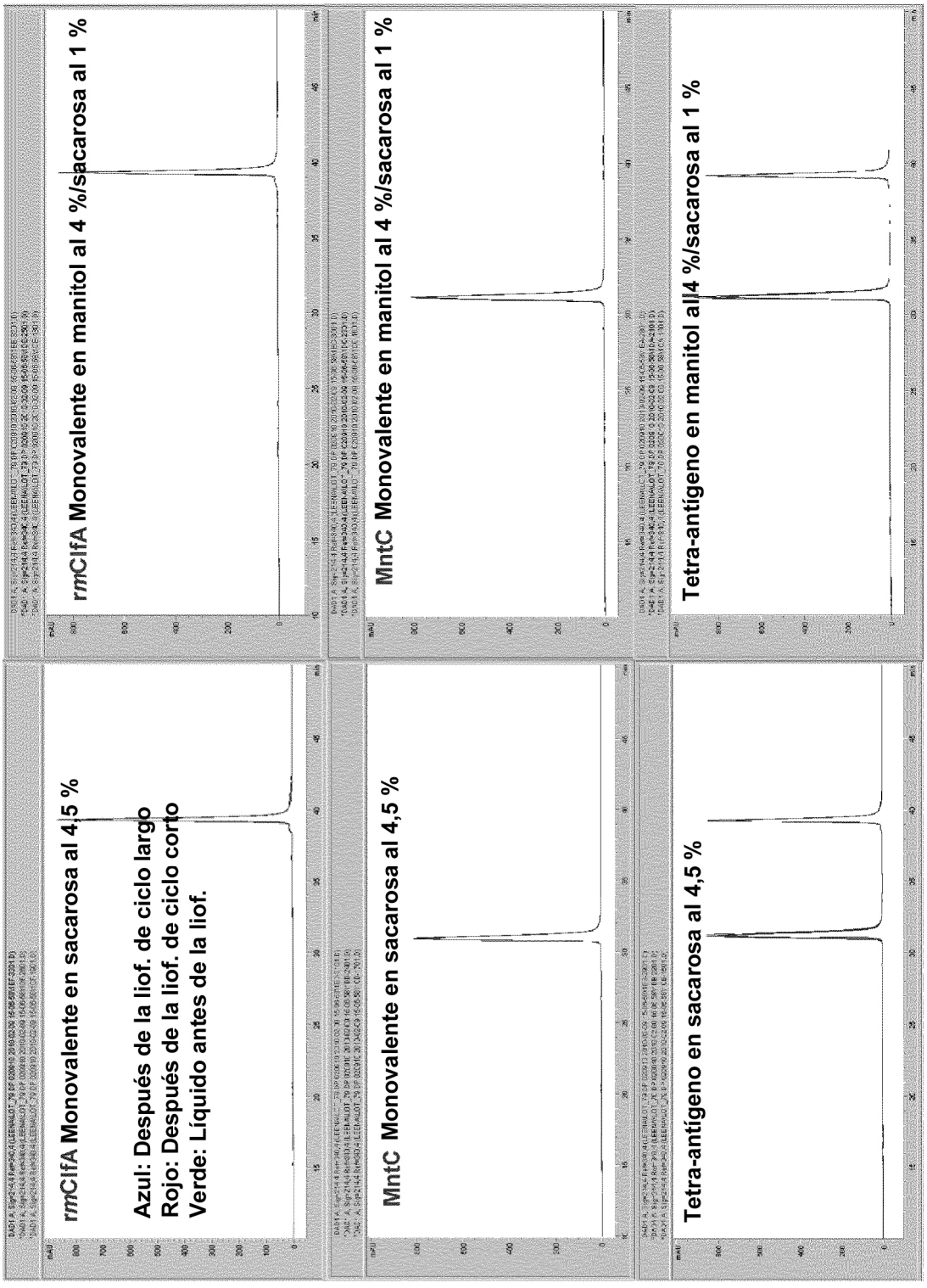

rmClfA Monovalente en sacarosa al 4,5 %
Azul: Después de la liof. de ciclo largo
Rojo: Después de la liof. de ciclo corto
Verde: Líquido antes de la liof.
rmClfA Monovalente en manitol al 4 %/sacarosa al 1 %
MntC Monovalente en sacarosa al 4,5 %
MntC Monovalente en manitol al 4 %/sacarosa al 1 %
Tetra-antígeno en sacarosa al 4,5 %
Tetra-antígeno en manitol al4 %/sacarosa al 1 %

FIGURA 27C

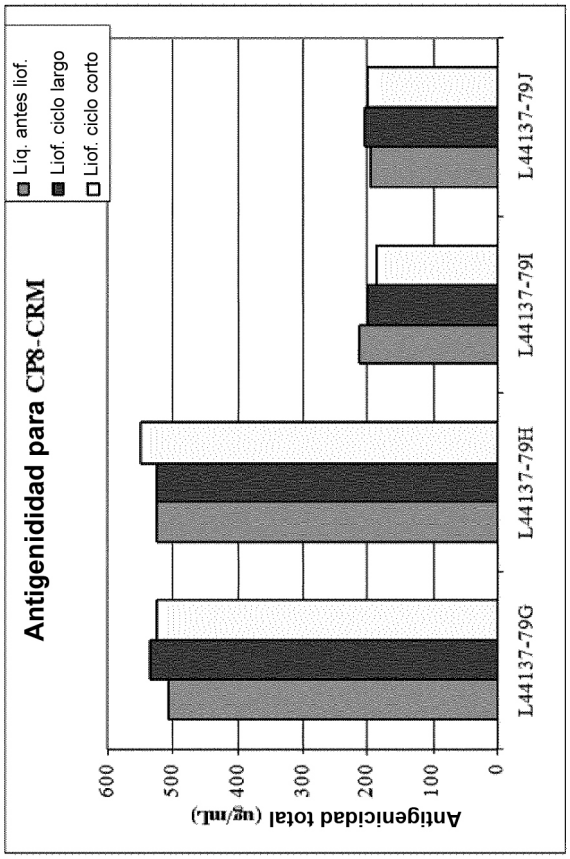


FIGURA 27B

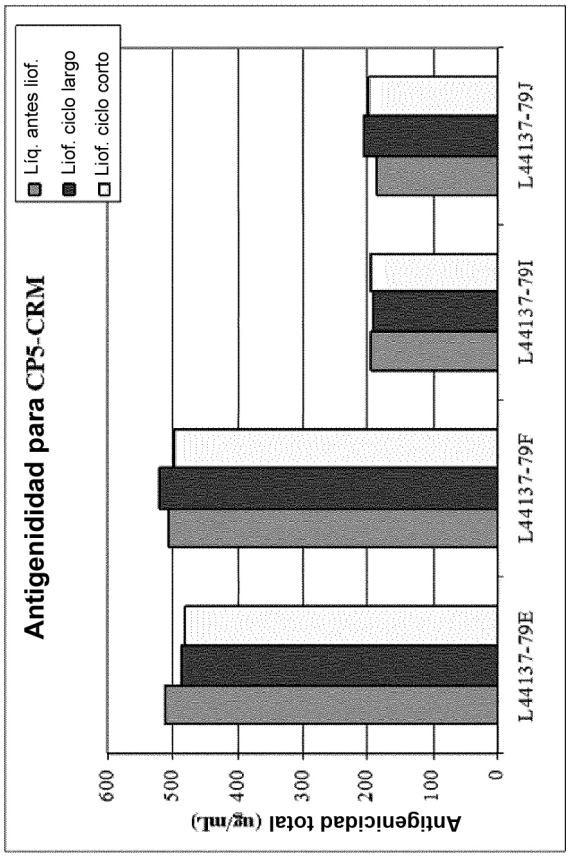


FIGURA 27D

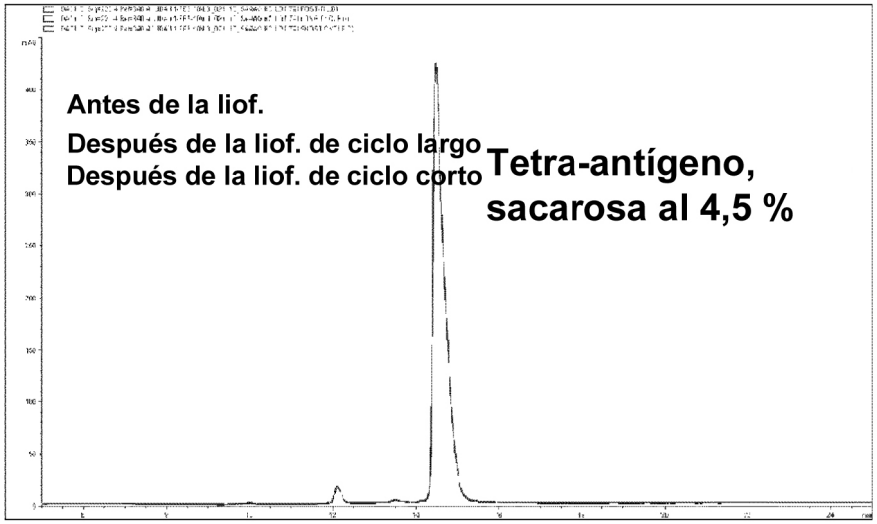


FIGURA 27E

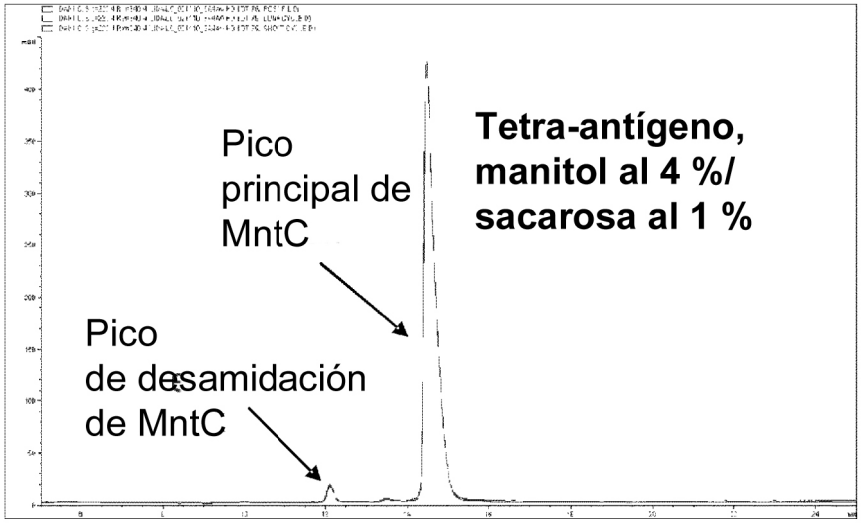


FIGURA 27F

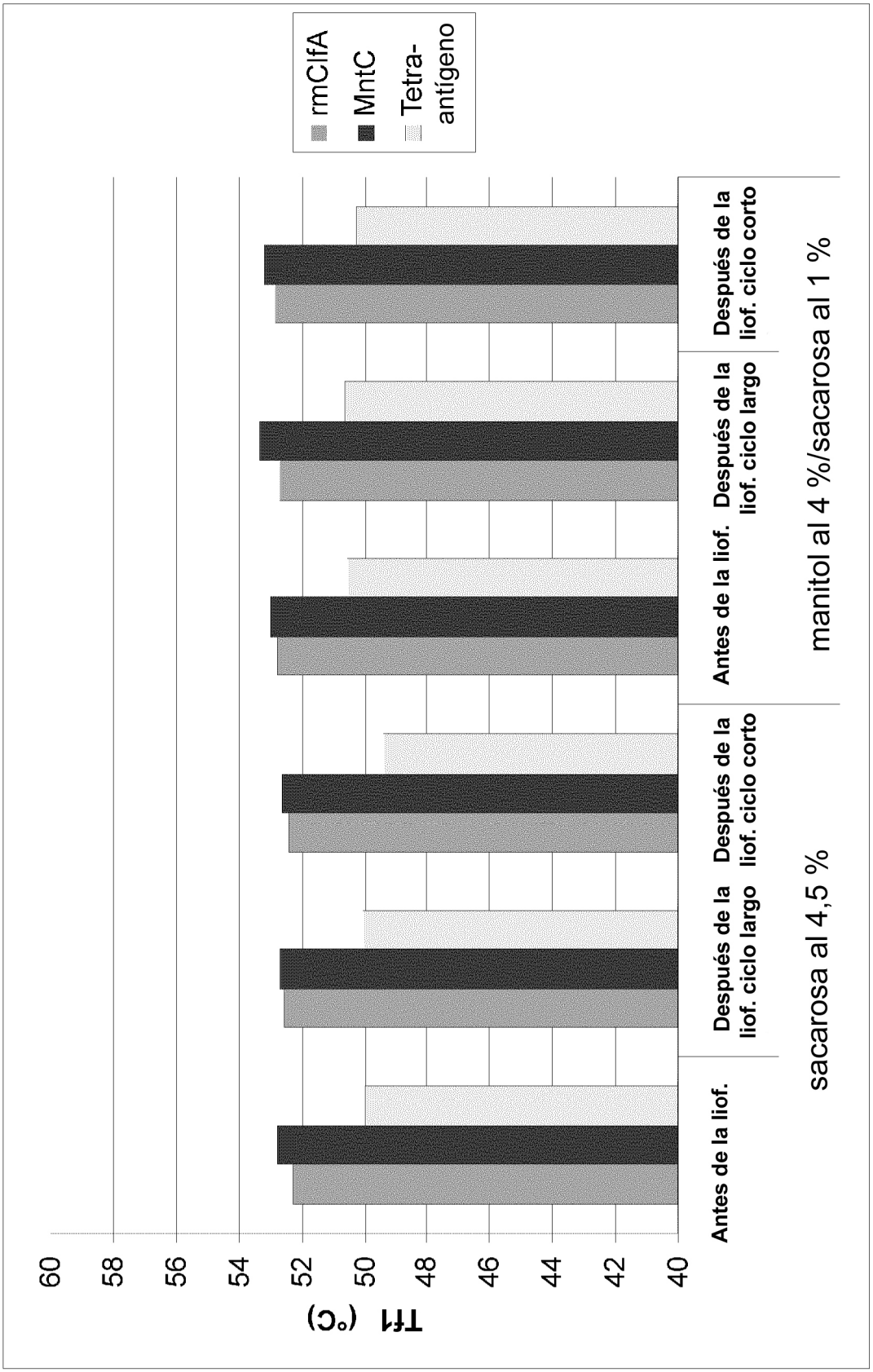

rmClfA
MntC
Tetra-antígeno
Tf1 (°C)
60
58
56
54
52
50
48
46
44
42
40
Antes de la liof.
Después de la liof. ciclo largo
Después de la liof. ciclo corto
Antes de la liof.
Después de la liof. ciclo largo
Después de la liof. ciclo corto
sacarosa al 4,5 %
manitol al 4 %/sacarosa al 1 %

FIGURA 27G

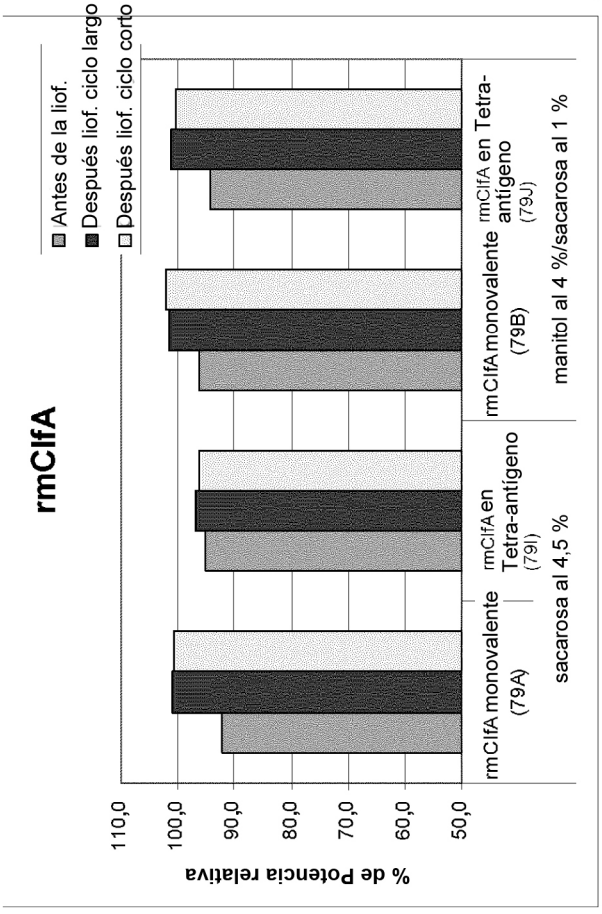


FIGURA 27H

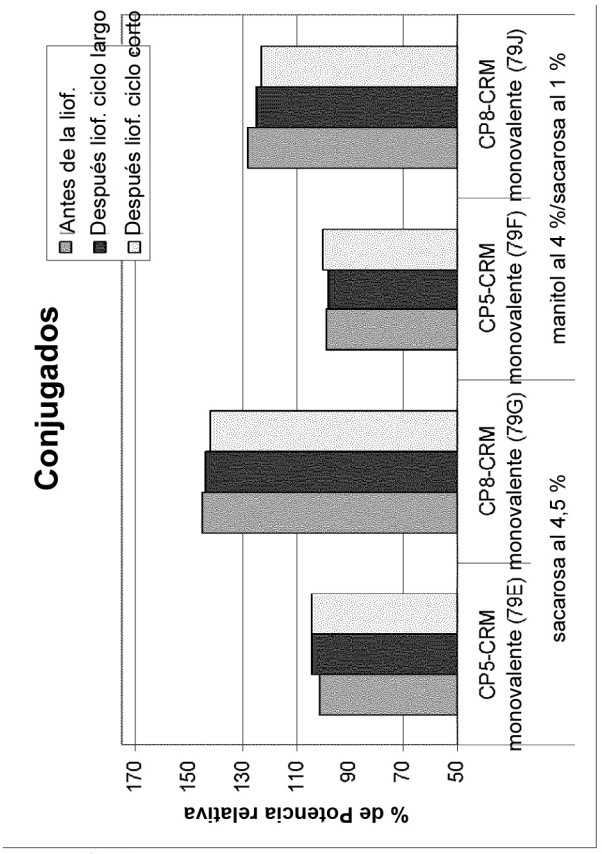


FIGURA 28

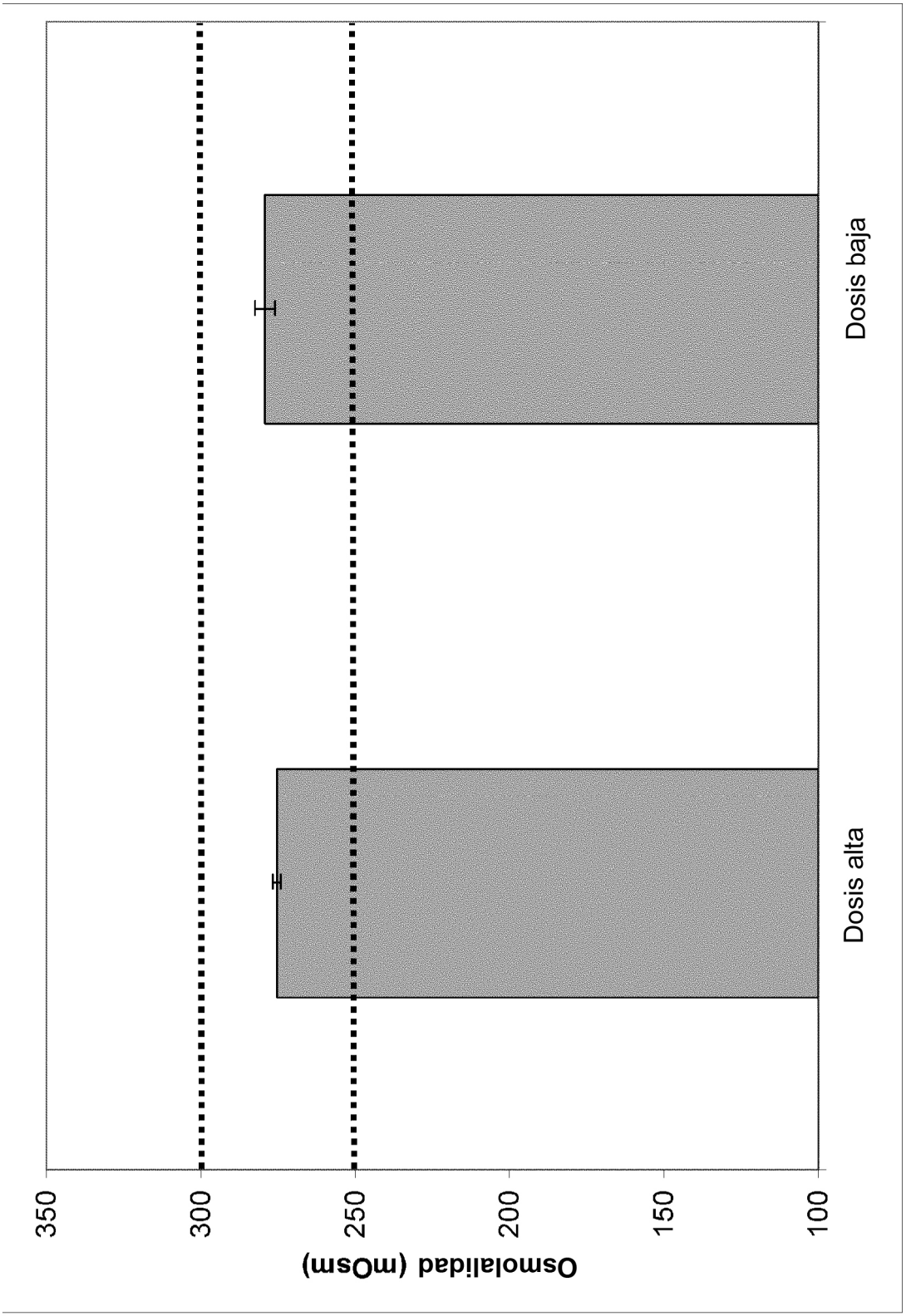

Osmolalidad (mOsm)
350
300
250
200
150
100
Dosis baja
Dosis alta

FIGURA 29B

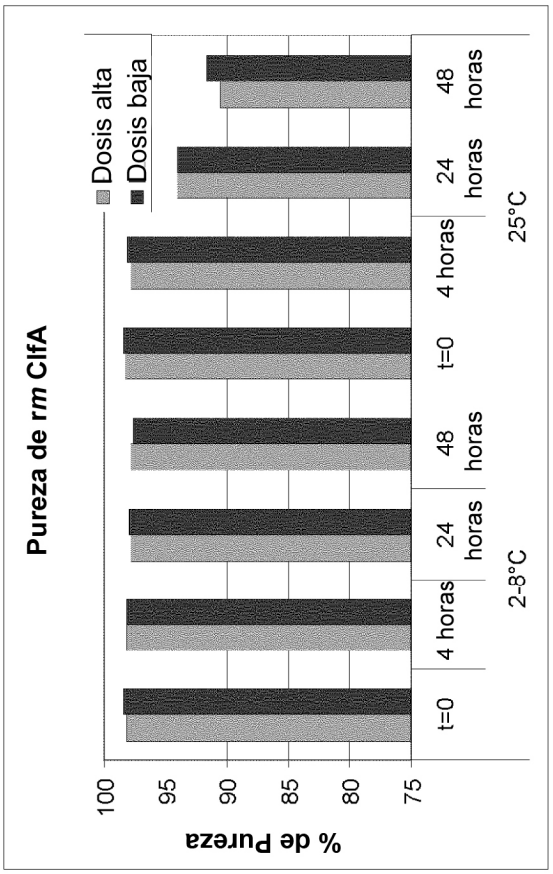


FIGURA 29A

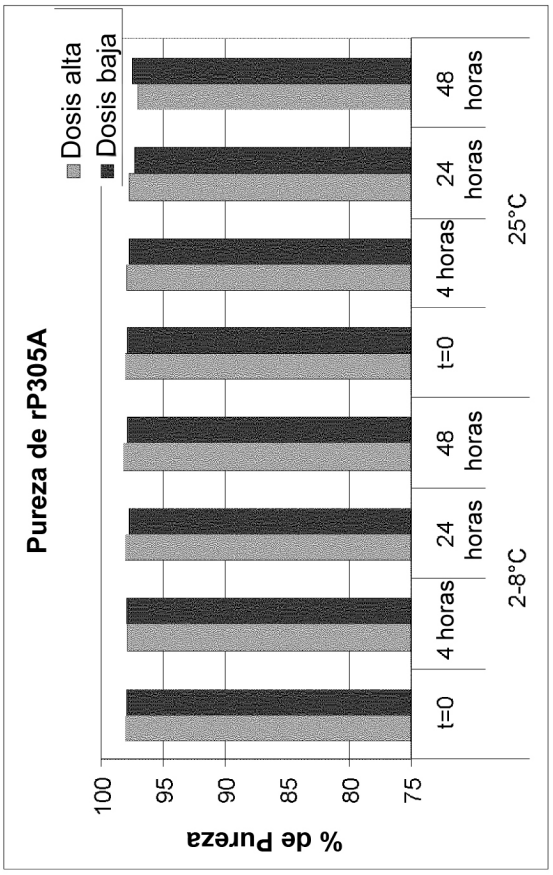


FIGURA 29C

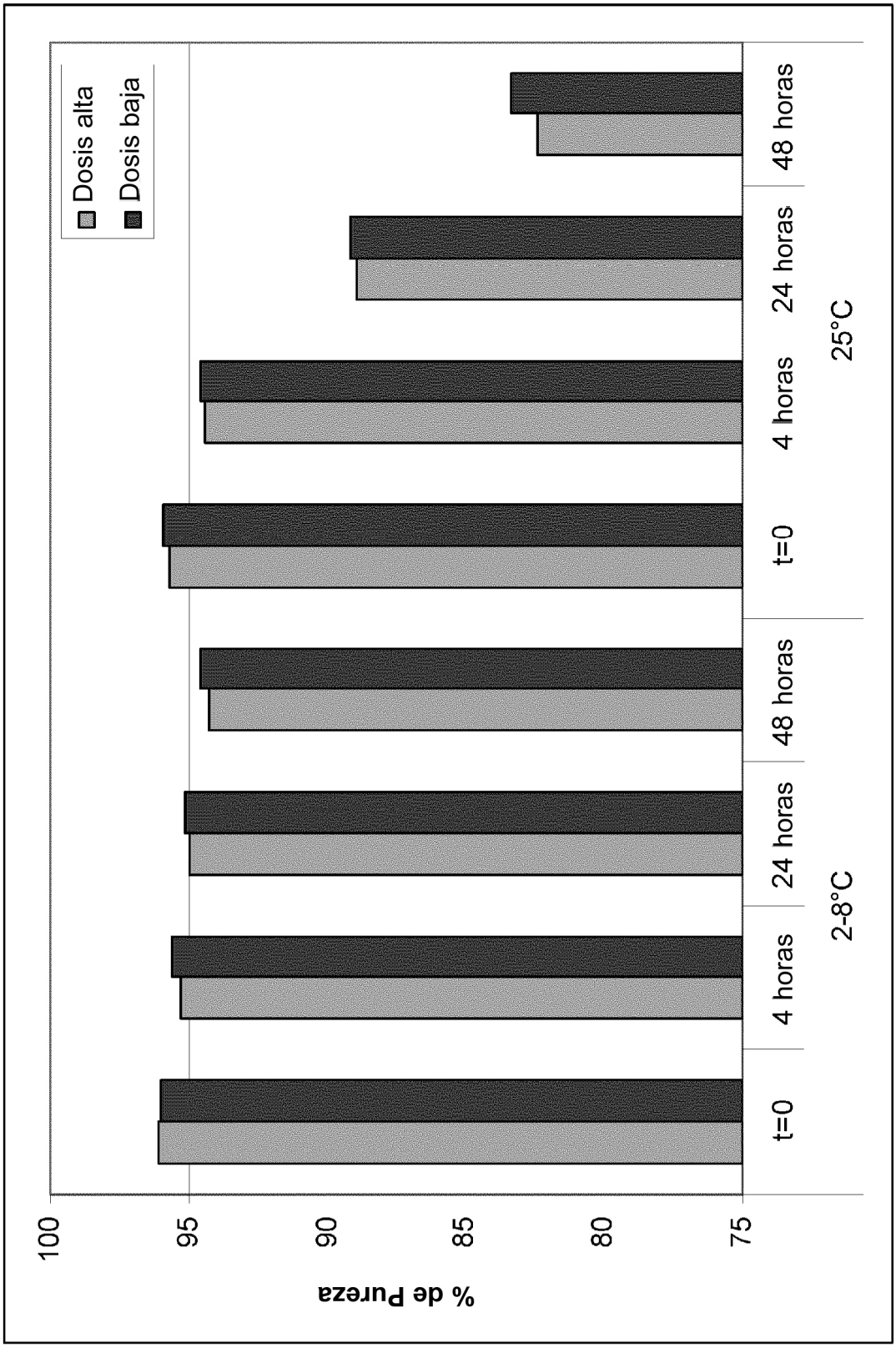

Dosis alta
Dosis baja
% de Pureza
100
95
90
85
80
75
t=0
4 horas
24 horas
48 horas
2-8°C
t=0
4 horas
24 horas
48 horas
25°C

FIGURA 29D

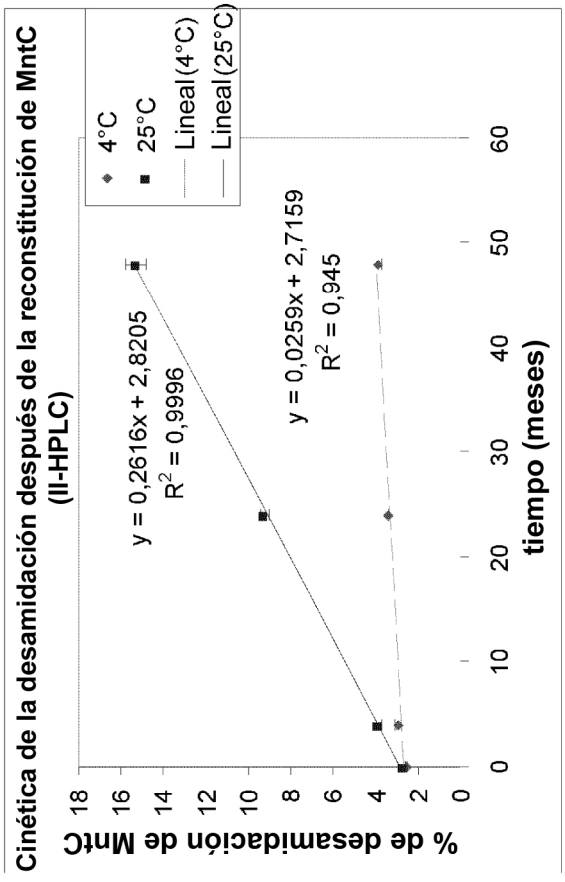


FIGURA 29E

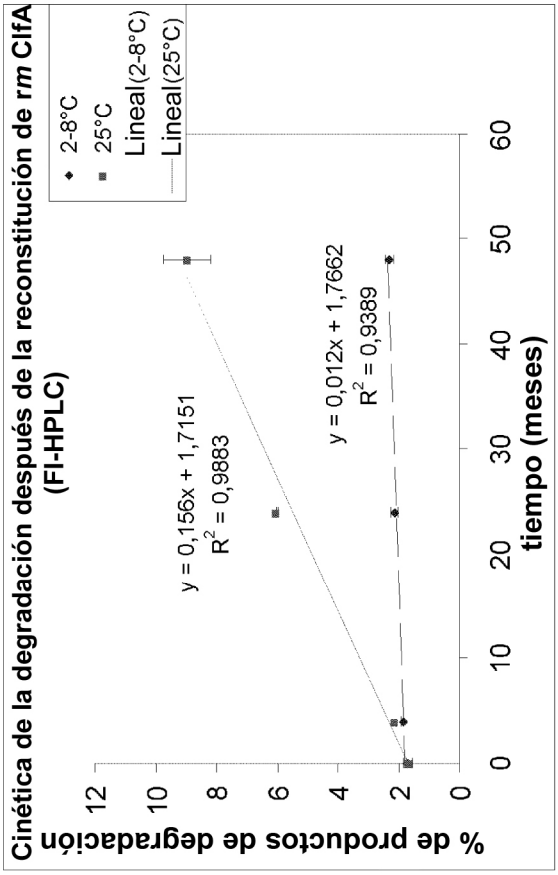


FIGURA 30A

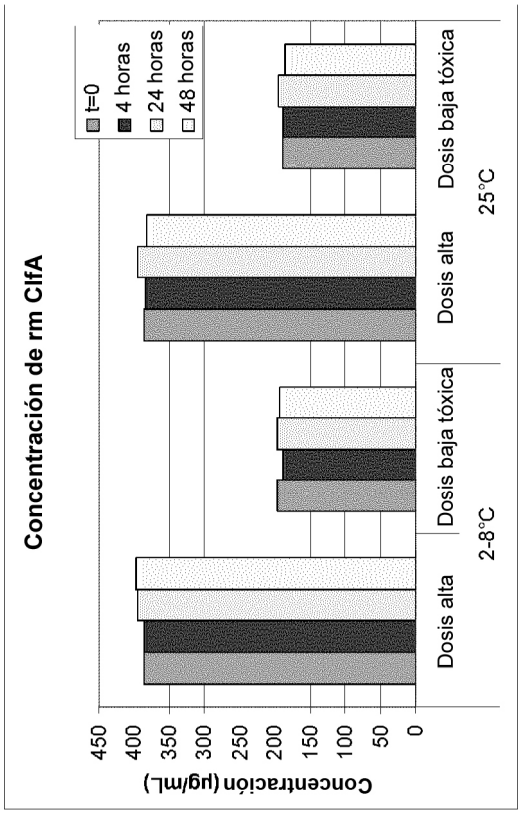


FIGURA 30B

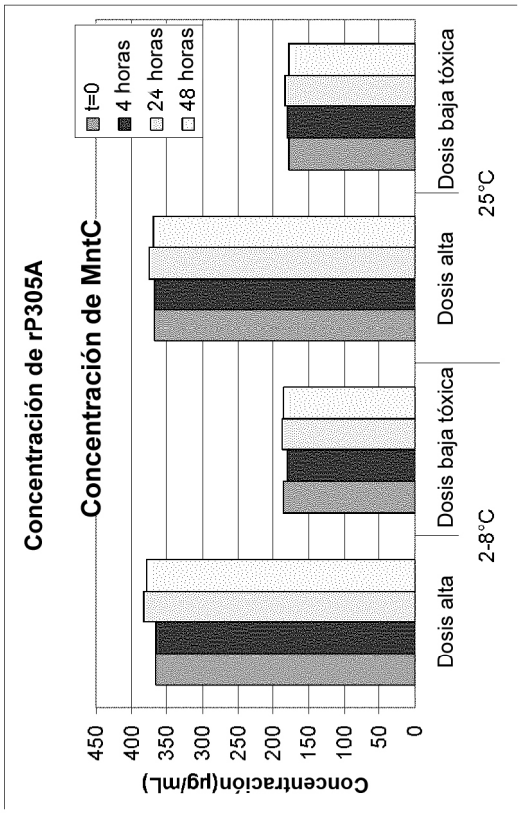


FIGURA 30C

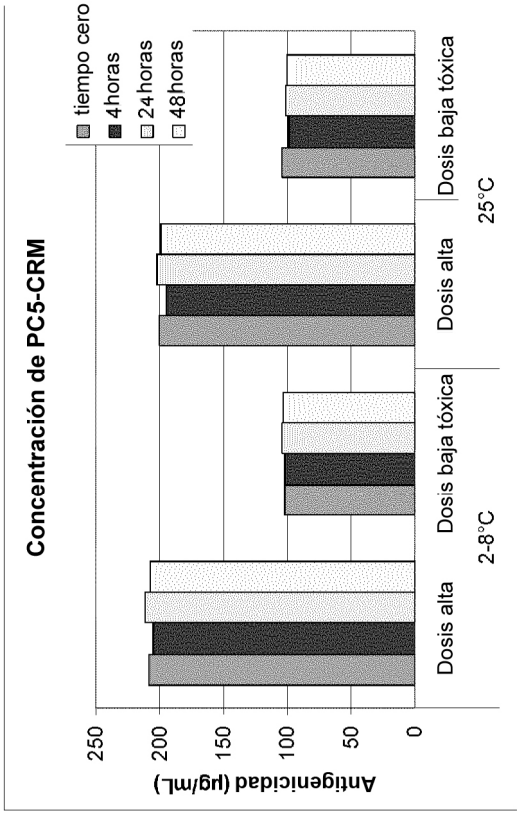


FIGURA 30D

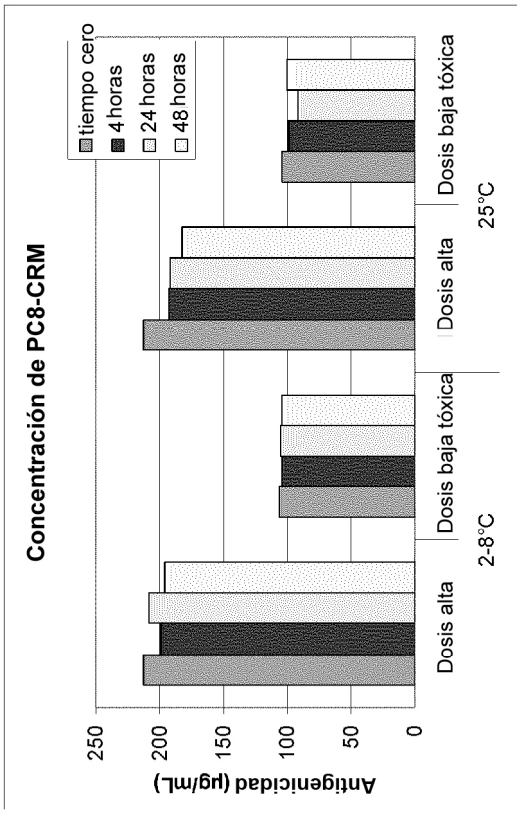


FIGURA 30E

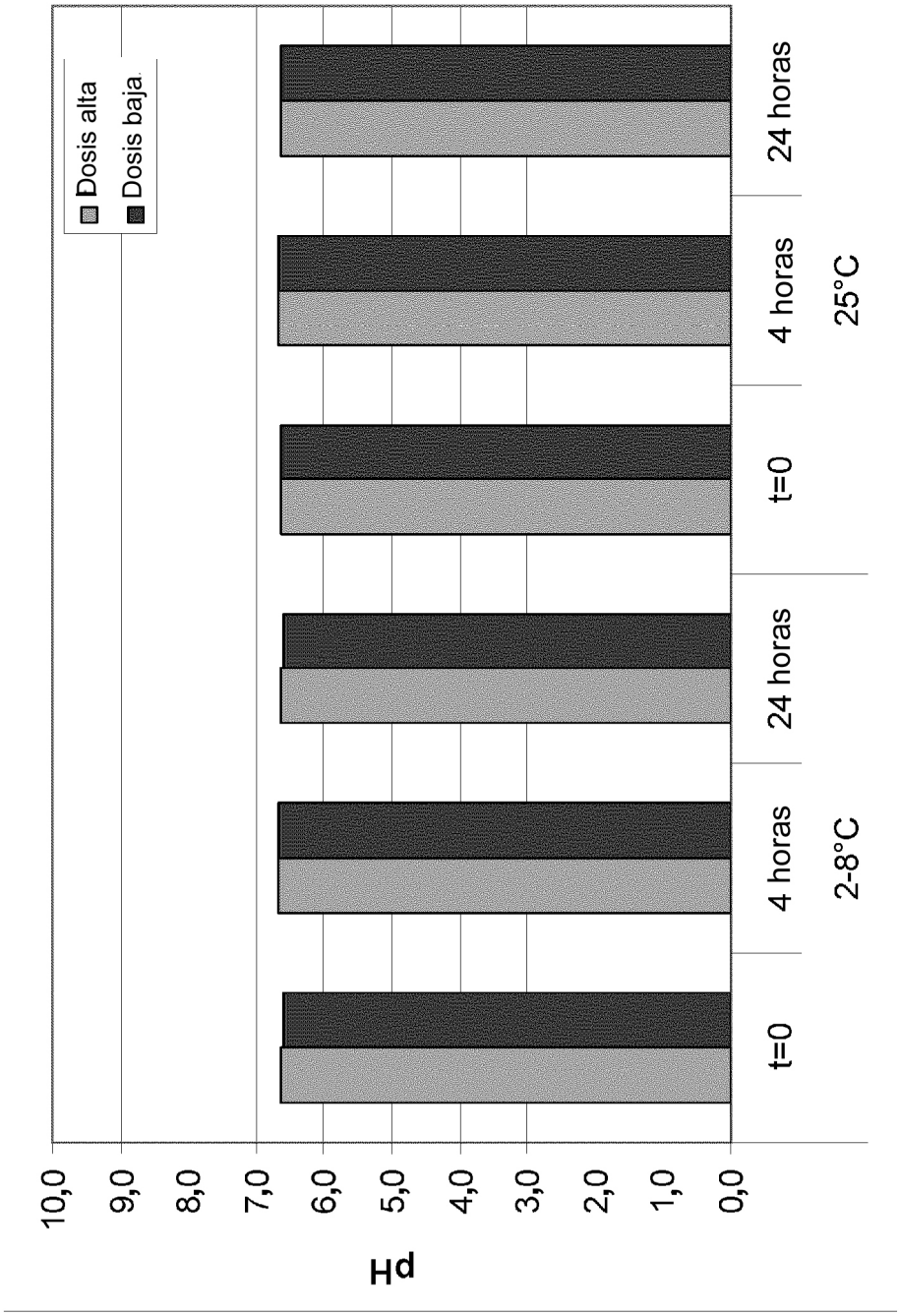

Dosis alta
Dosis baja
pH
10,0
9,0
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
t=0
4 horas
24 horas
t=0
4 horas
24 horas
2-8°C
25°C

FIGURA 31A

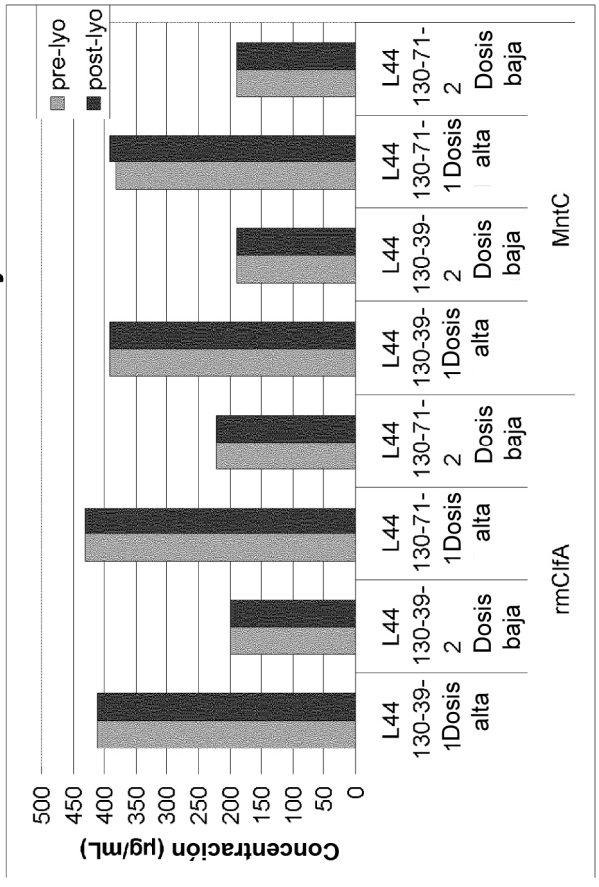


FIGURA 31B

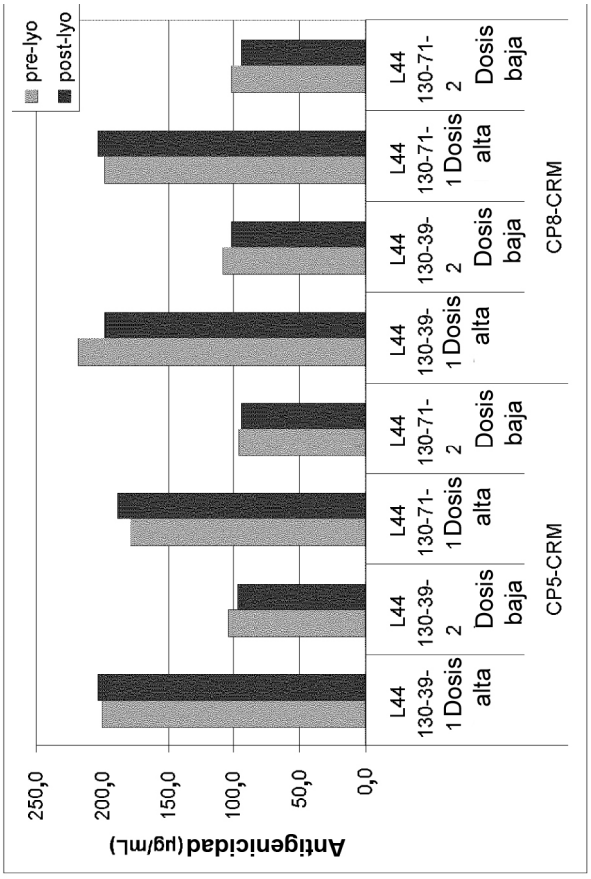


FIGURA 31C

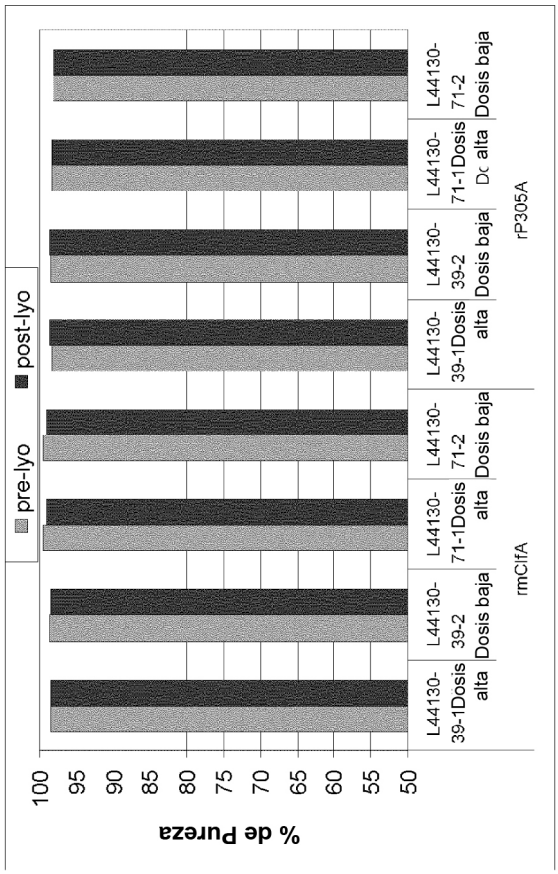


FIGURA 31D

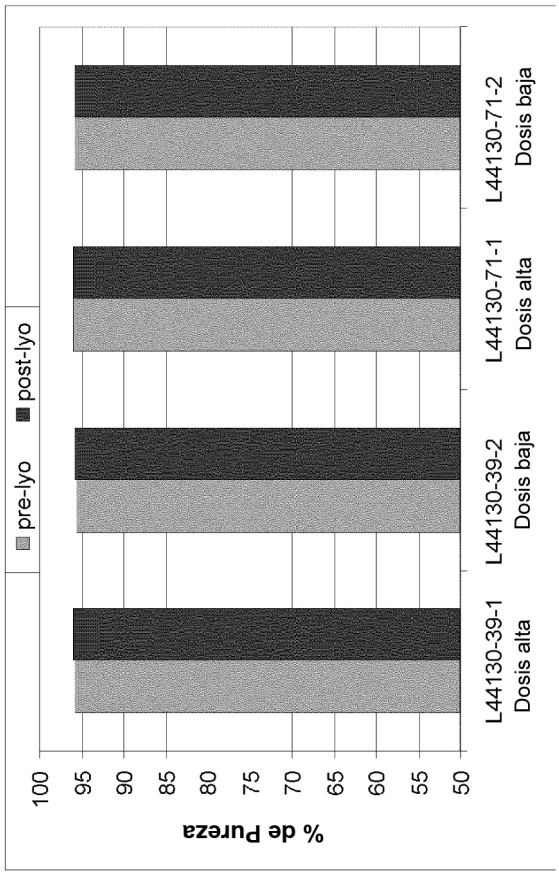


FIGURA 32A

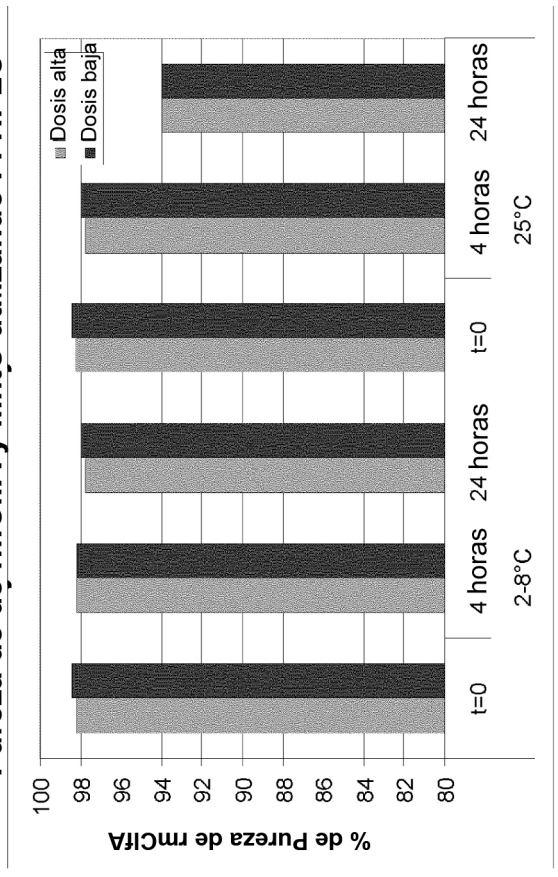


FIGURA 32B



FIGURA 32C

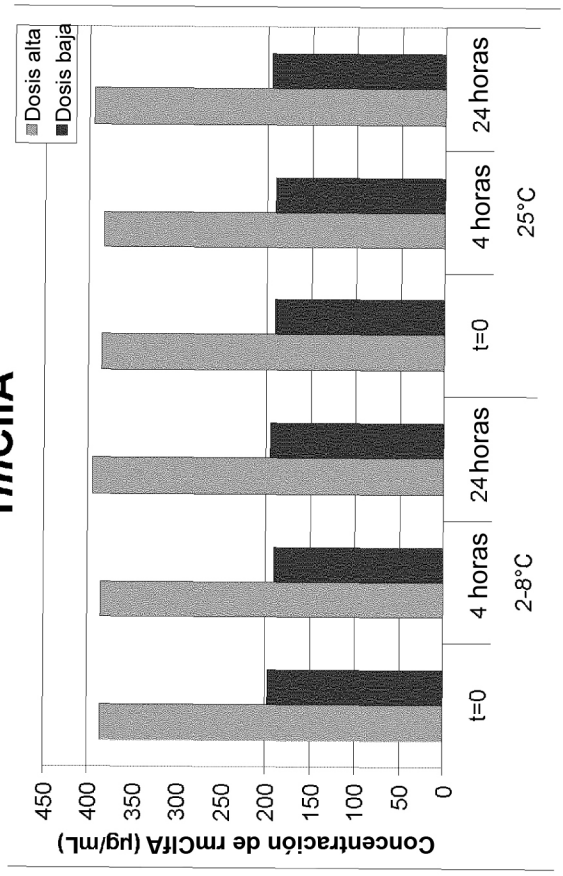


FIGURA 32D

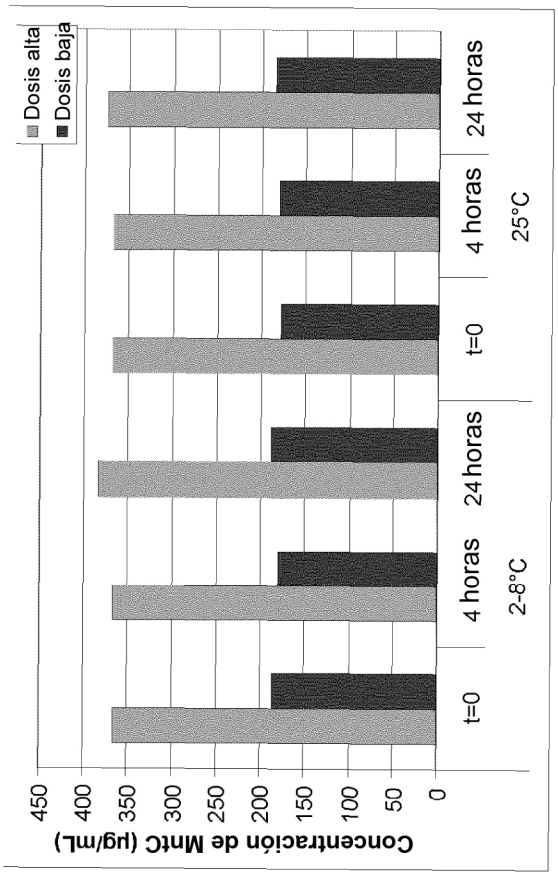


FIGURA 32E

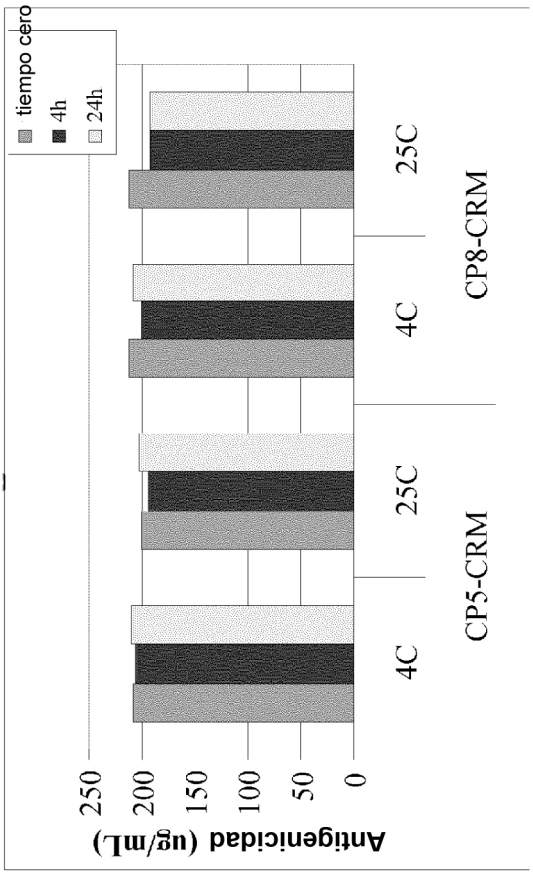


FIGURA 32F

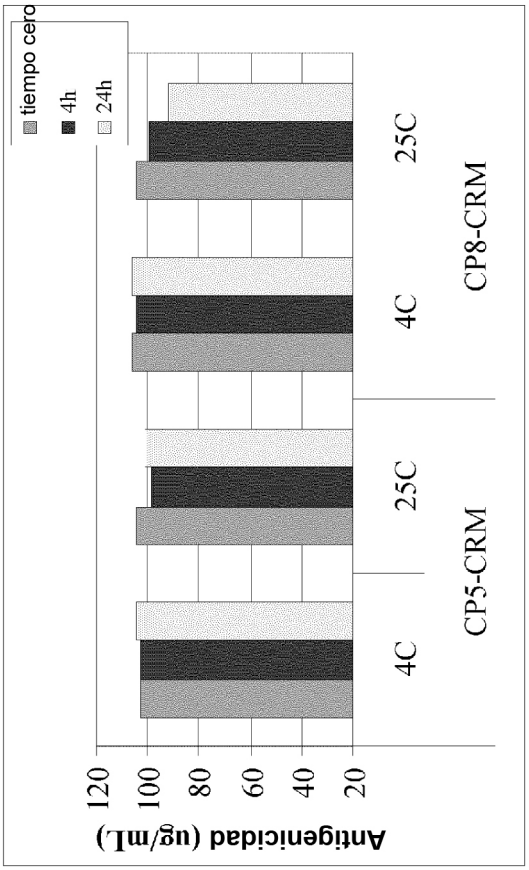


FIGURA 32G

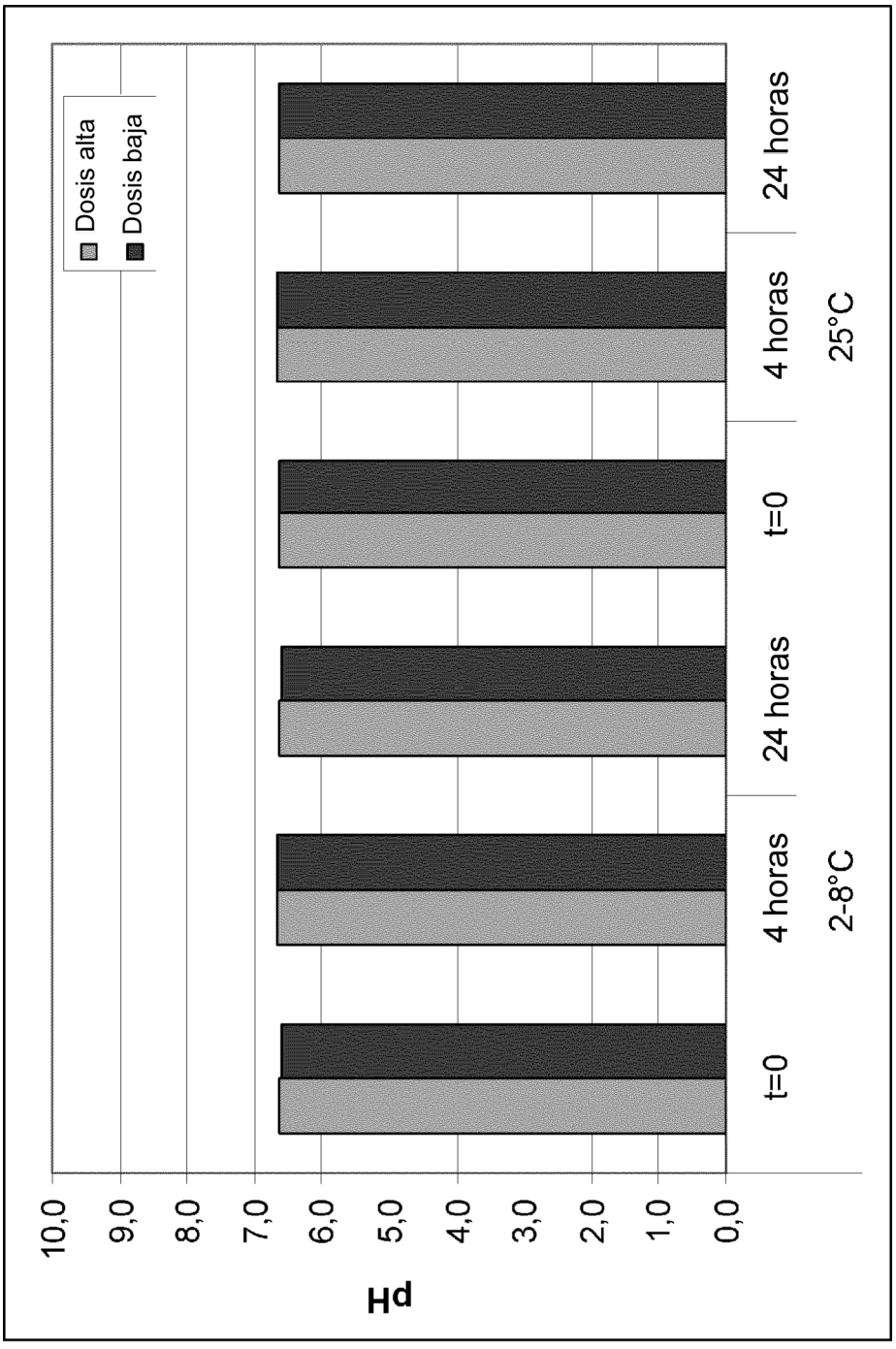

Dosis alta
Dosis baja
pH
10,0
9,0
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
t=0
4 horas
24 horas
t=0
4 horas
24 horas
2-8°C
25°C

FIGURA 33A

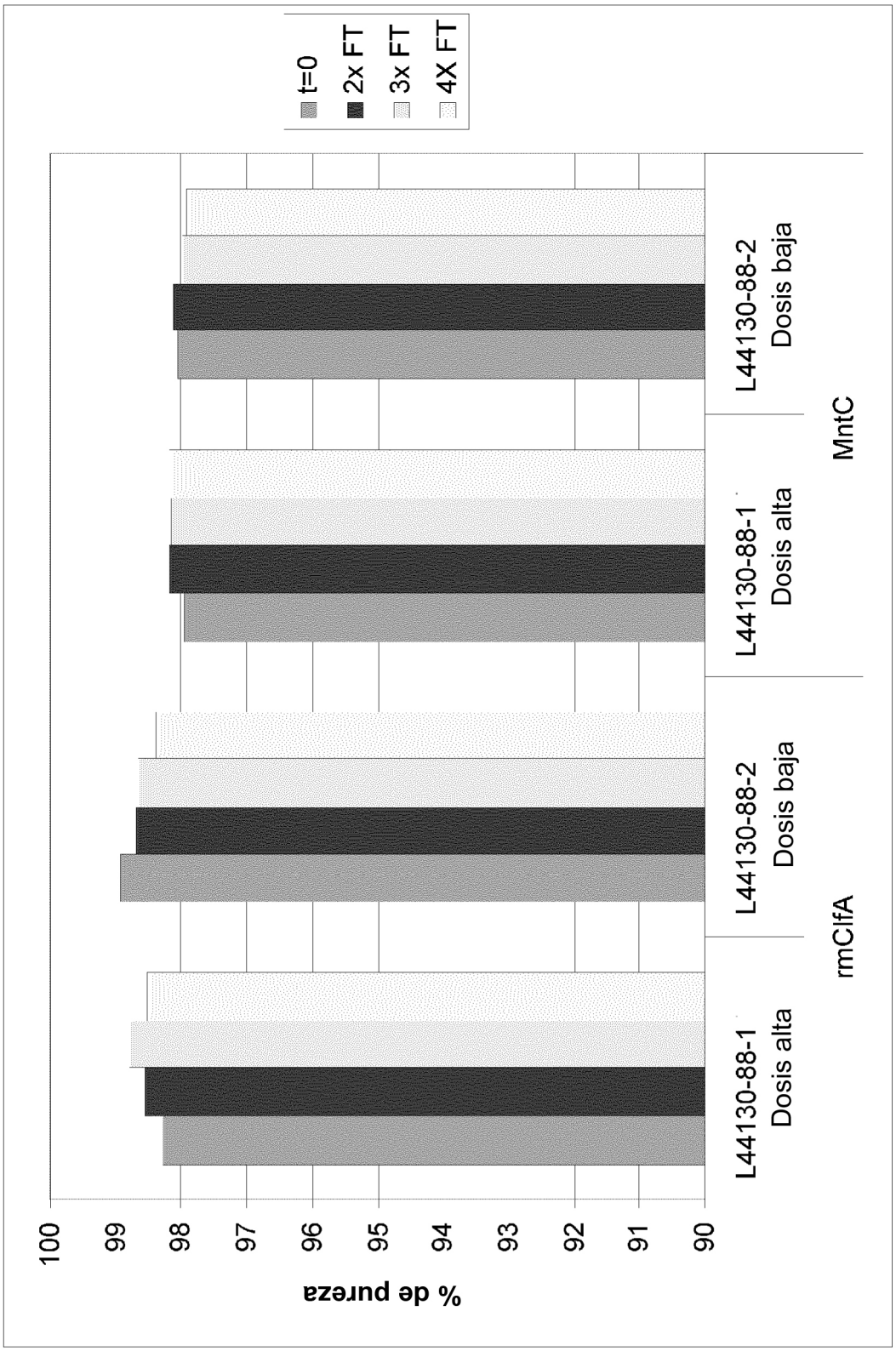

t=0
2x FT
3x FT
4X FT
% de pureza
100
99
98
97
96
95
94
93
92
91
90
L44130-88-1
Dosis alta
L44130-88-2
Dosis baja
rmClfA
L44130-88-1
Dosis alta
L44130-88-2
Dosis baja
MntC

FIGURA 33B

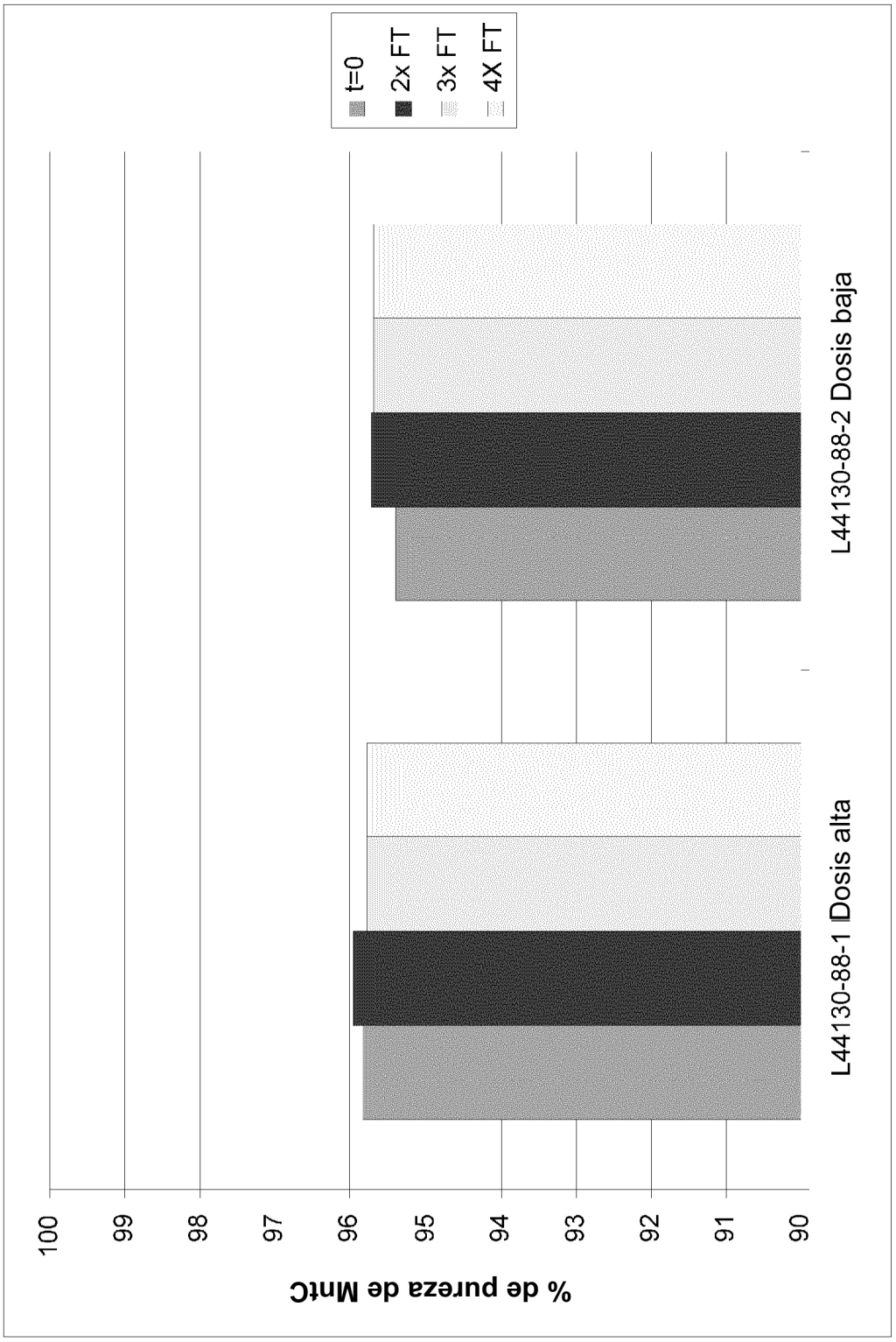

t=0
2x FT
3x FT
4X FT
% de pureza de MntC
100
99
98
97
96
95
94
93
92
91
90
L44130-88-1 Dosis alta
L44130-88-2 Dosis baja

FIGURA 33C

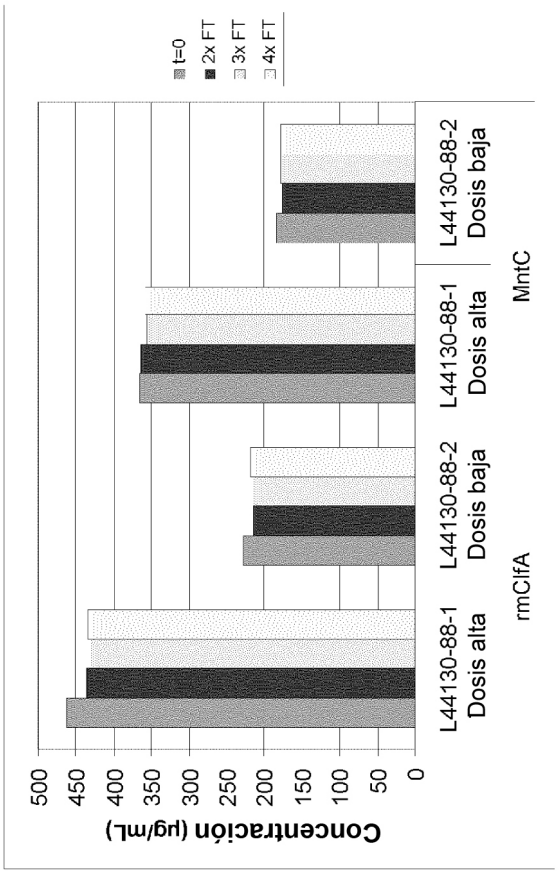


FIGURA 33D

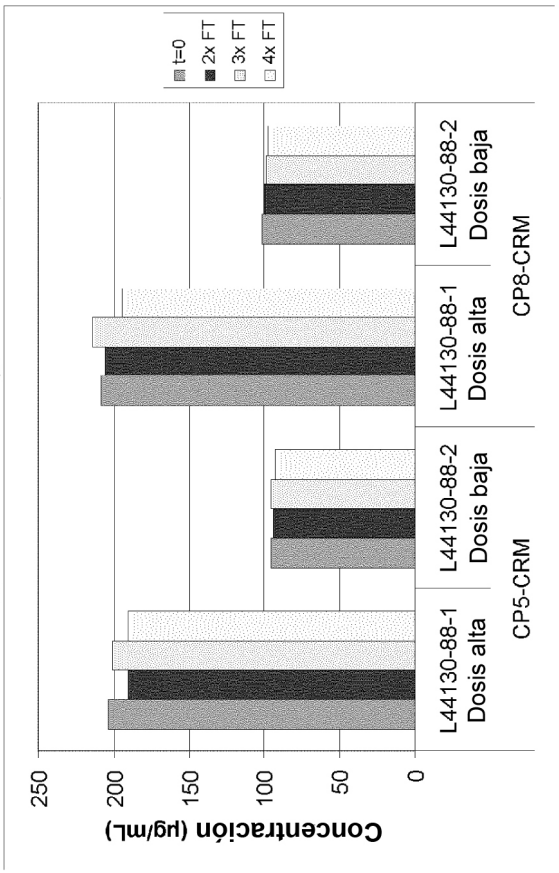


FIGURA 33E

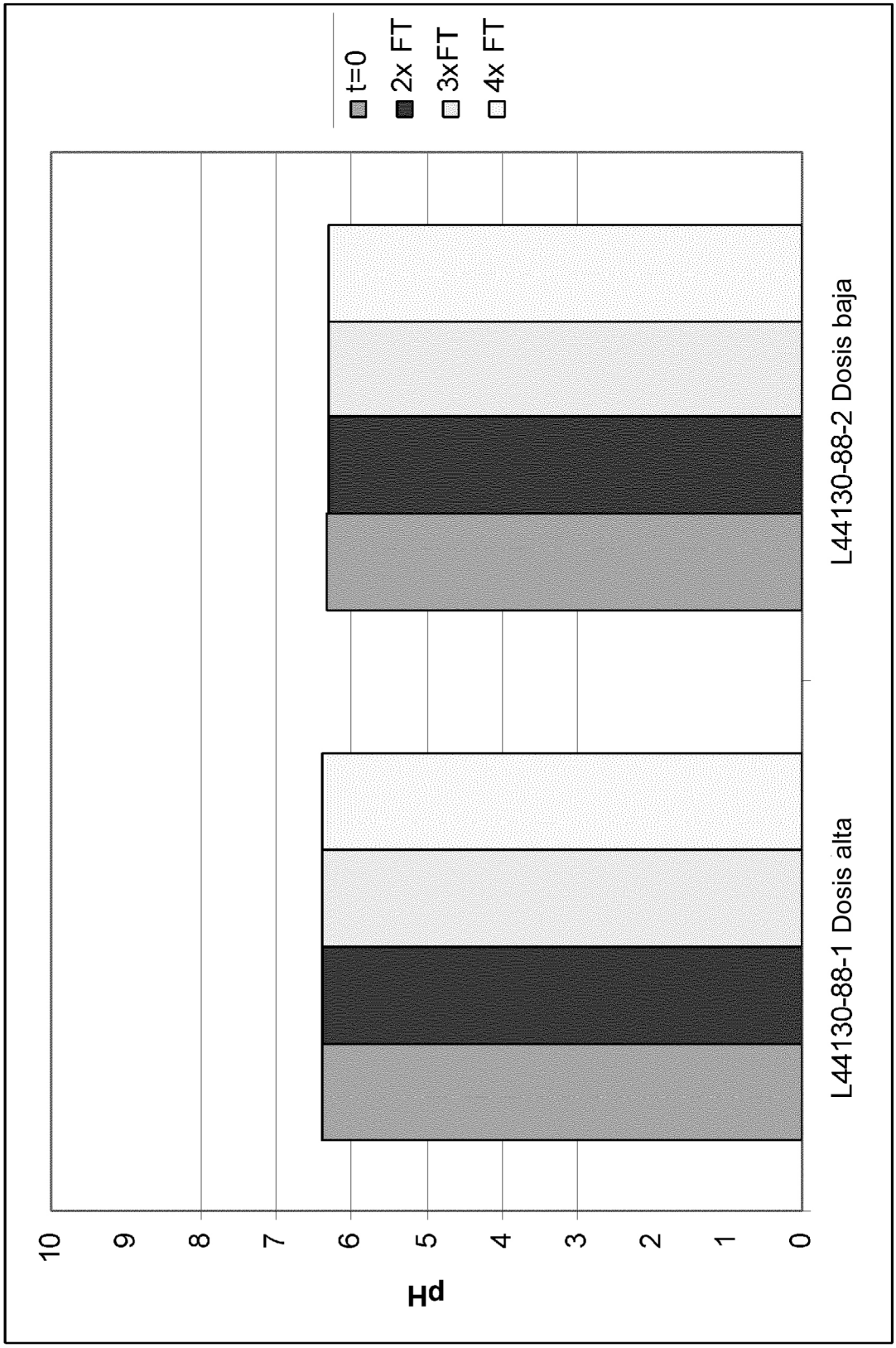

t=0
2x FT
3xFT
4x FT
pH
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
L44130-88-1 Dosis alta
L44130-88-2 Dosis baja

FIGURA 34A

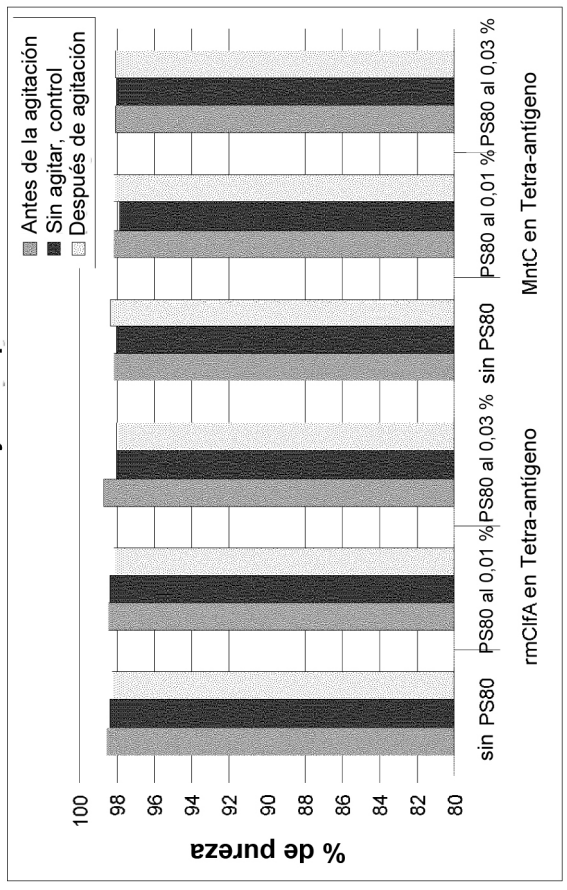


FIGURA 34B

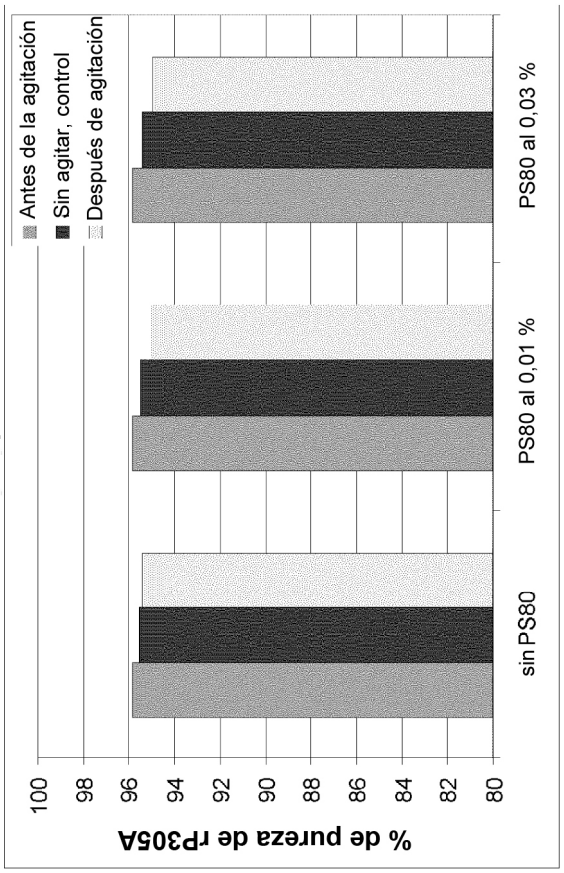


FIGURA 34C

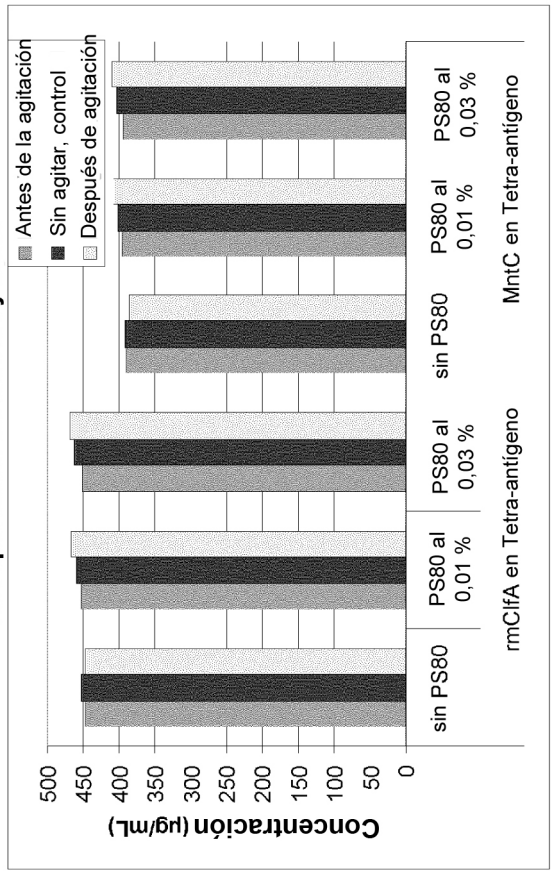


FIGURA 34D

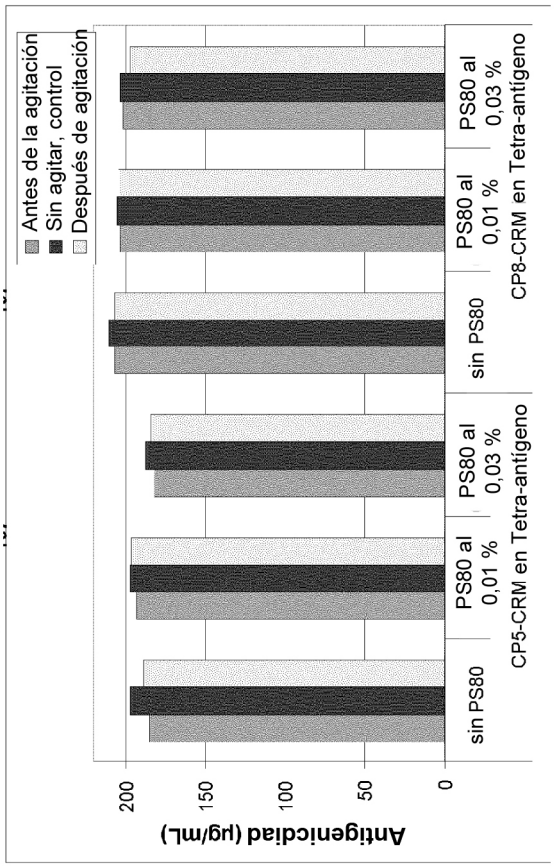


FIGURA 34E

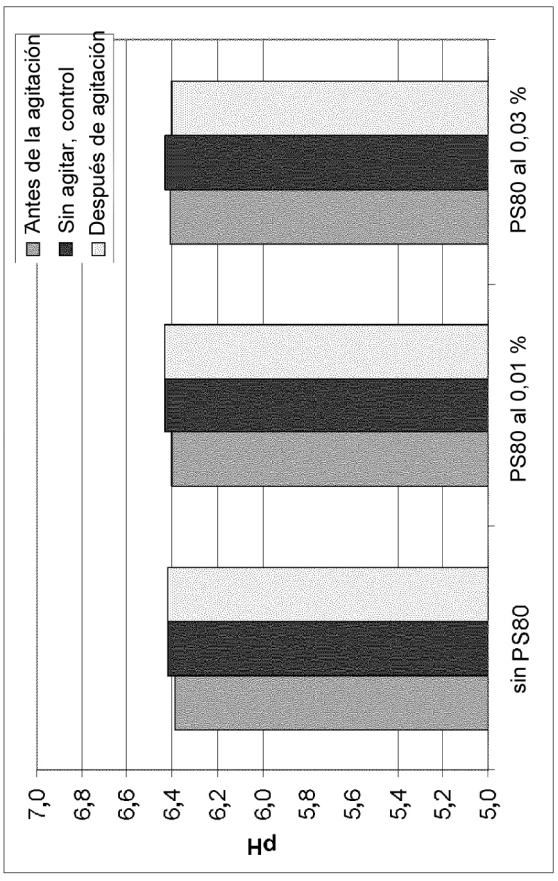


FIGURA 34F

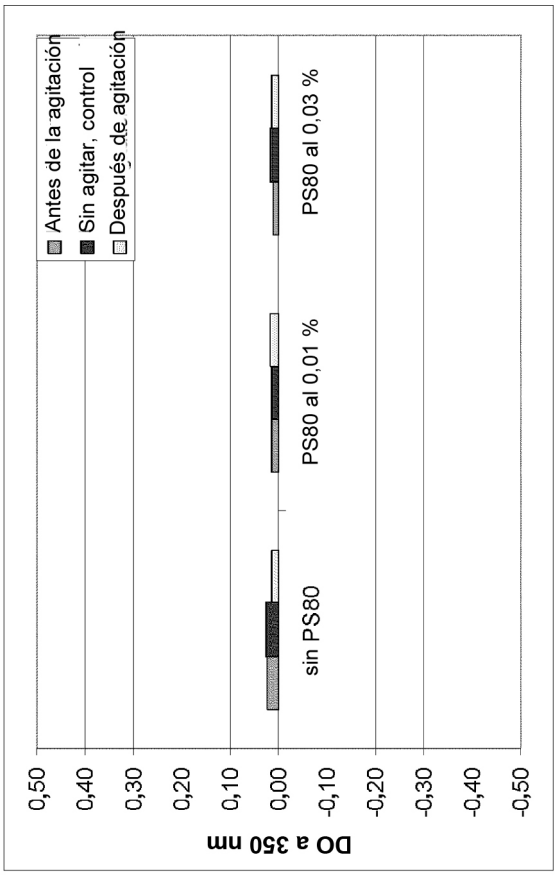


FIGURA 35A

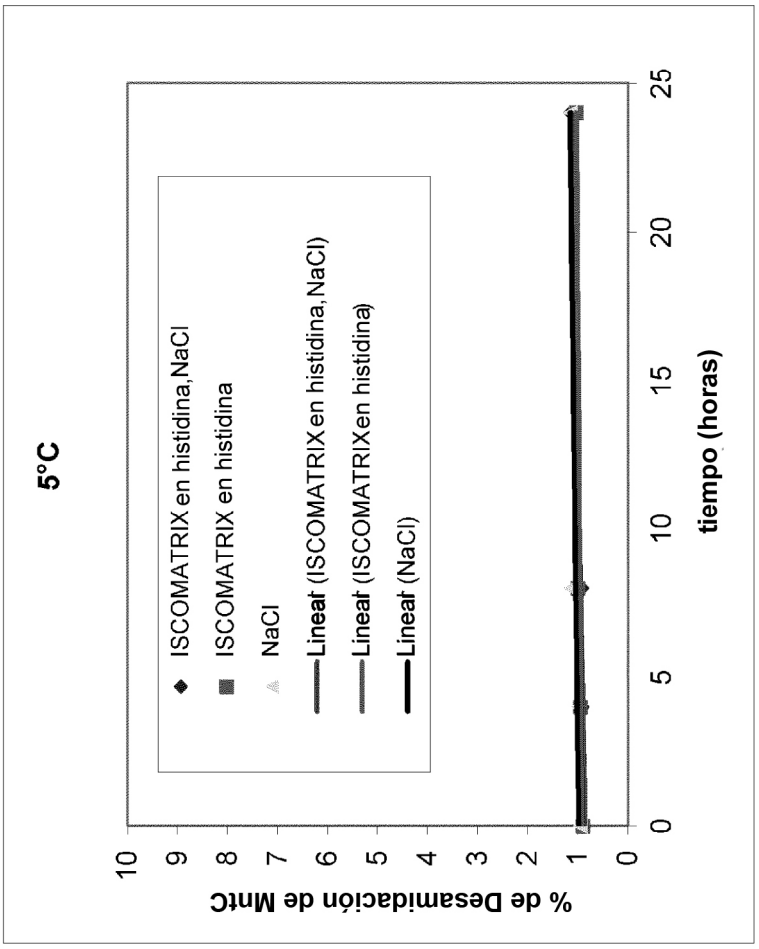


FIGURA 35B

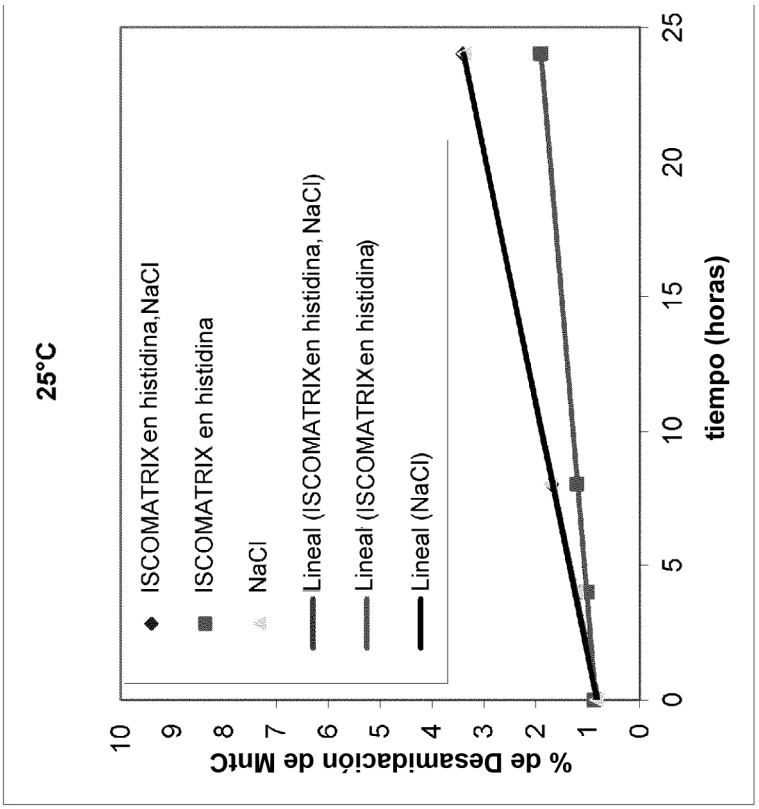


FIGURA 35C

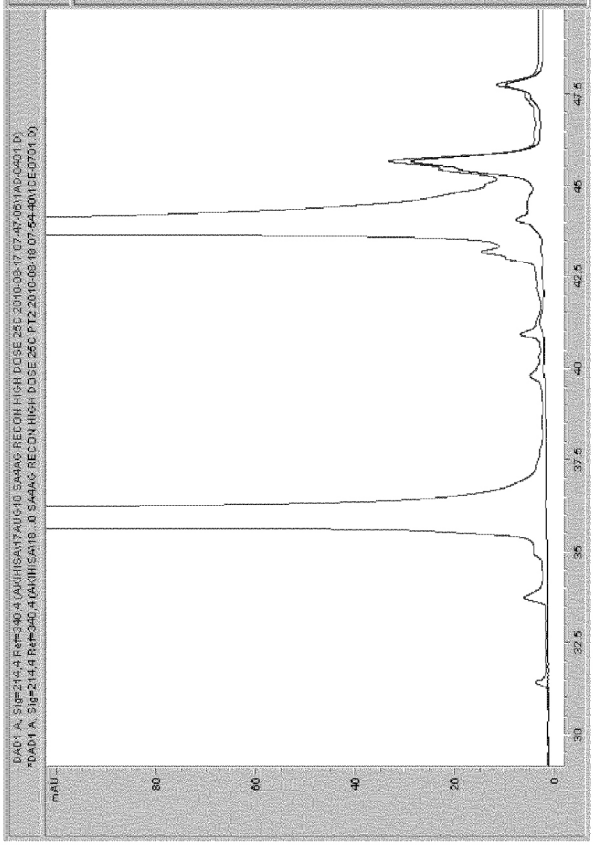


FIGURA 35D

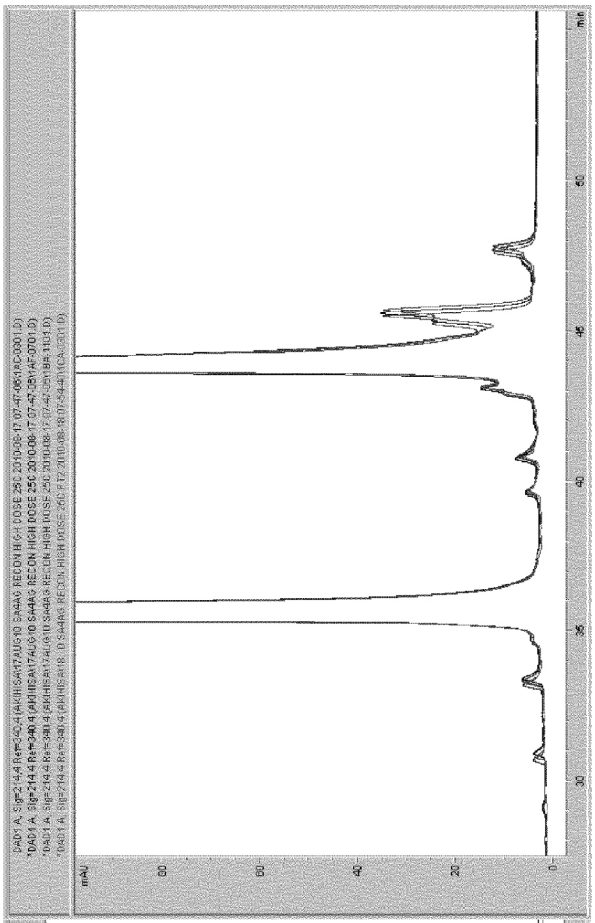


FIGURA 35E

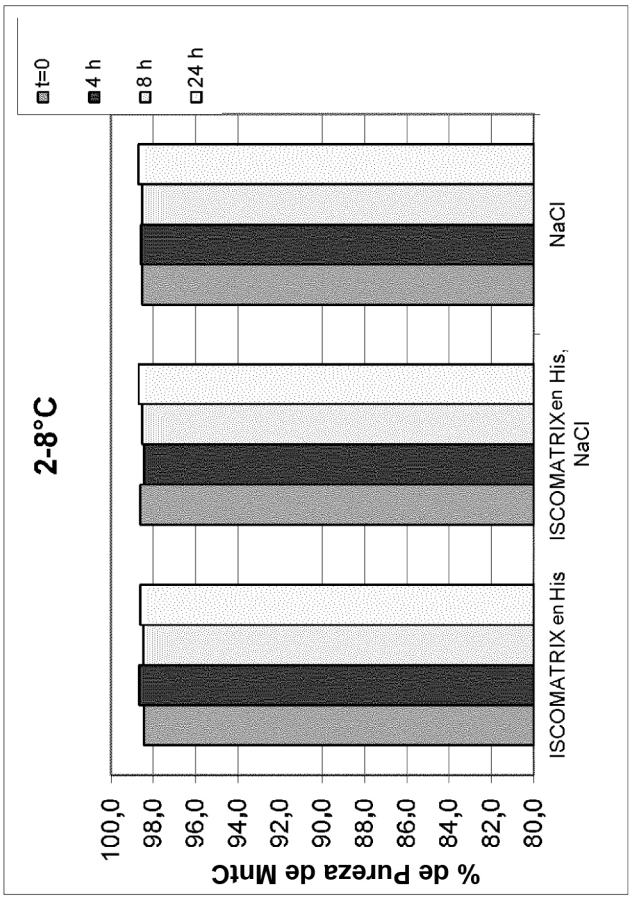


FIGURA 35F

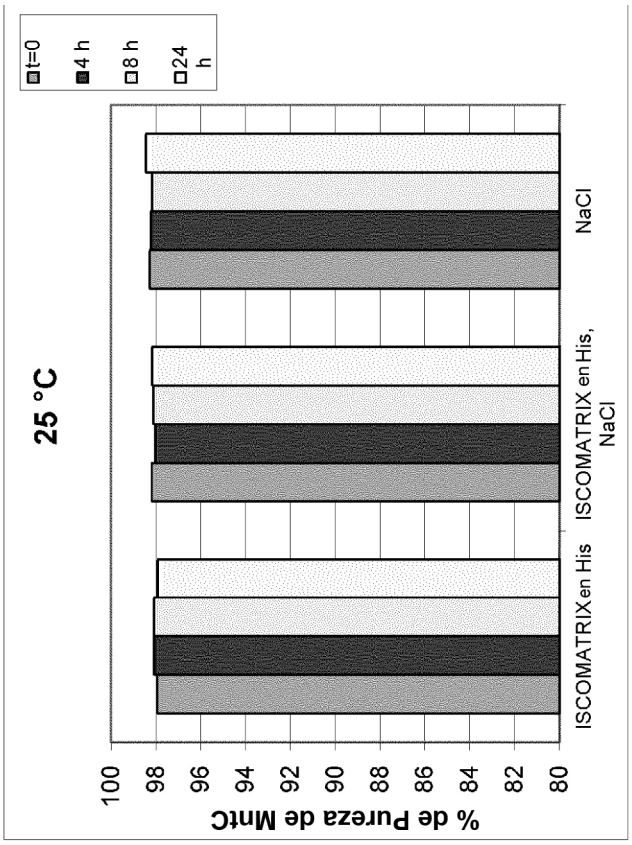


FIGURA 35H

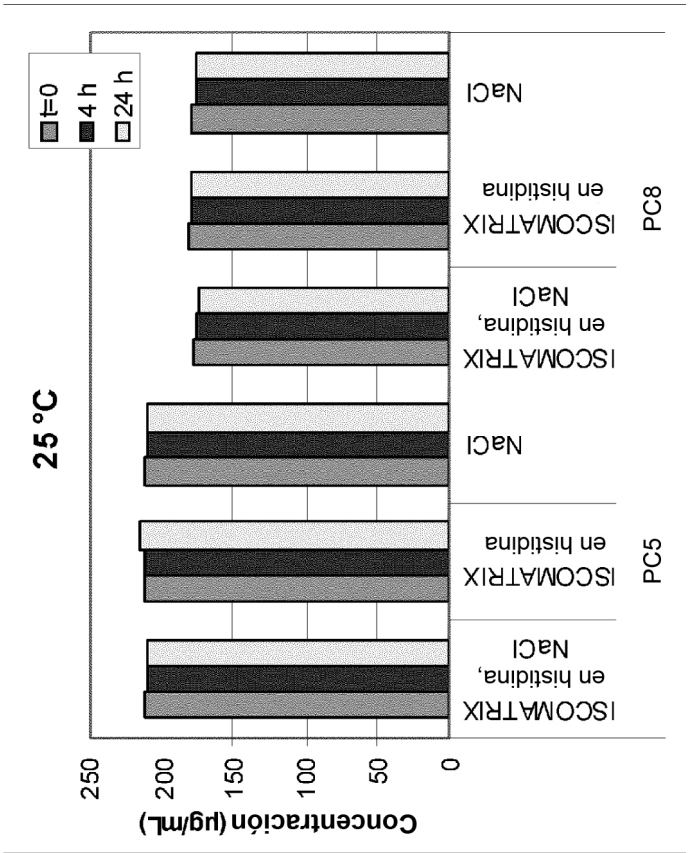


FIGURA 35G

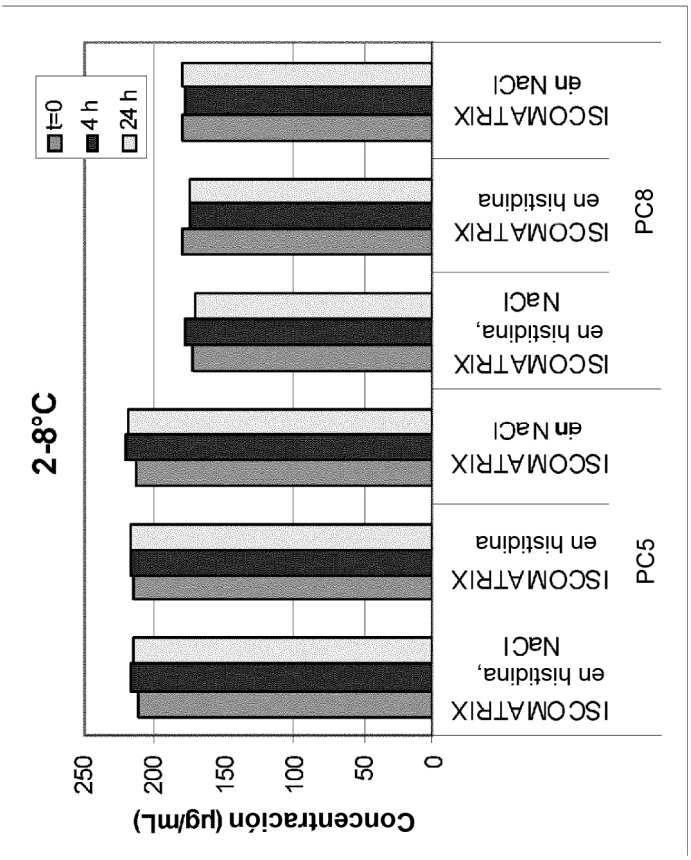


FIGURA 35J

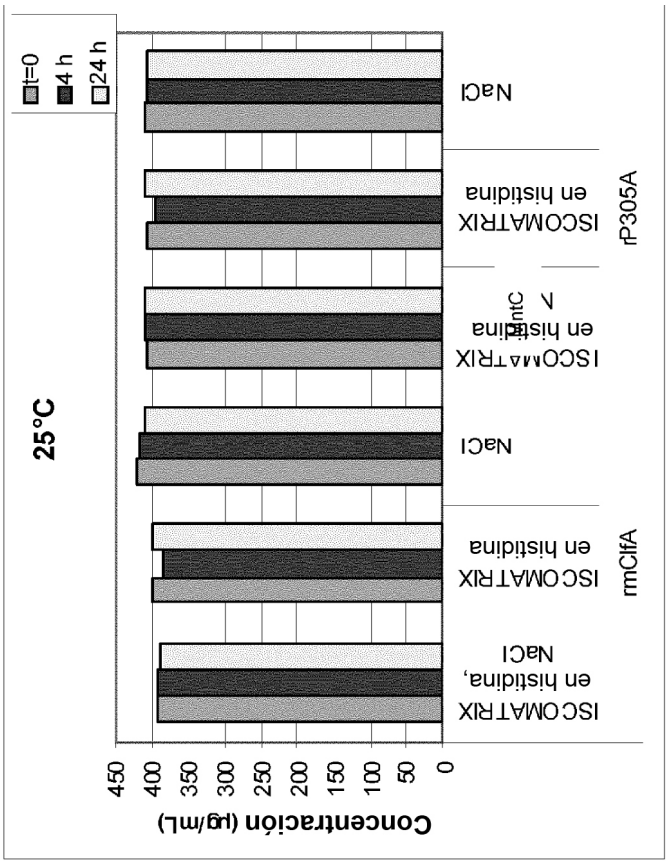


FIGURA 35I

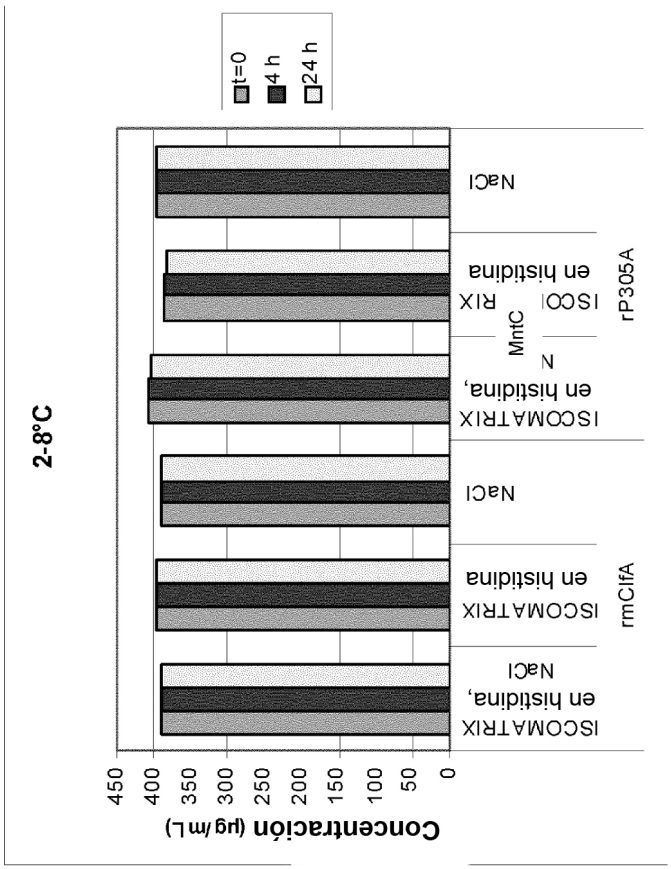


FIGURA 36B

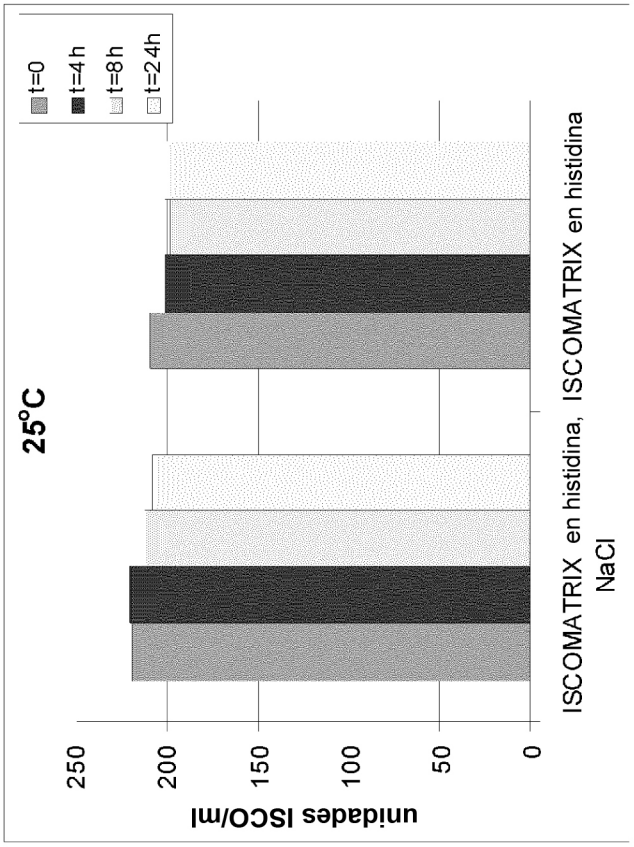


FIGURA 36A

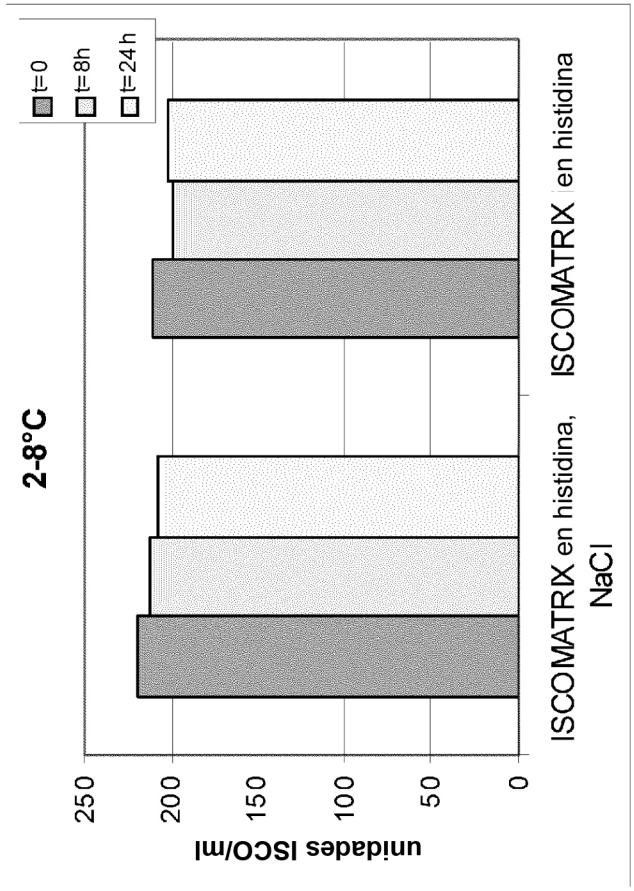


FIGURA 36C

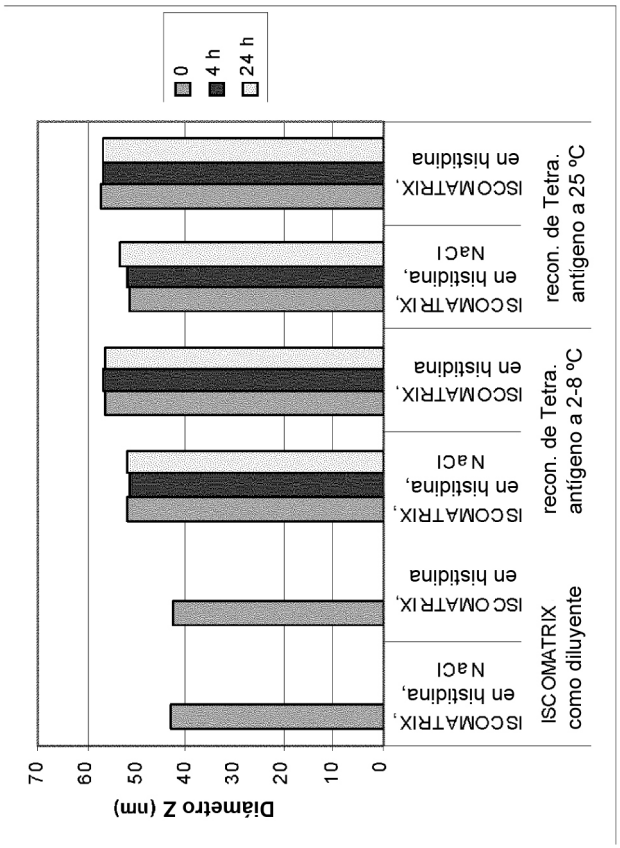


FIGURA 36D

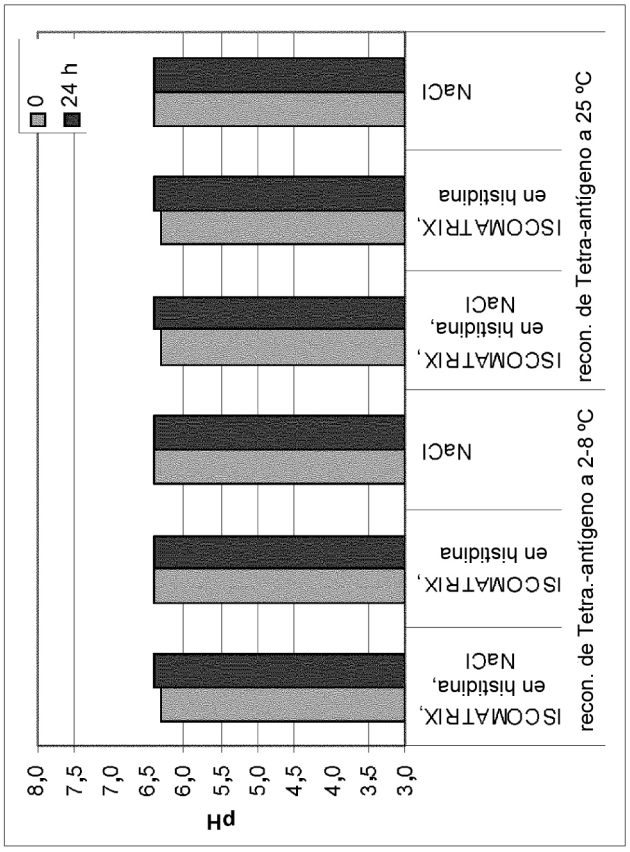


FIGURA 37A

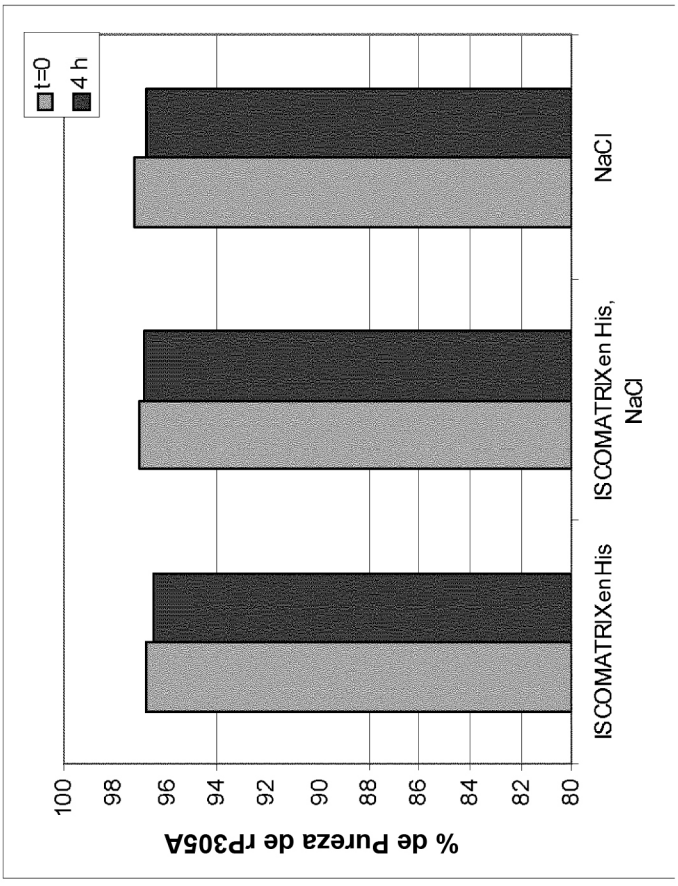


FIGURA 37B

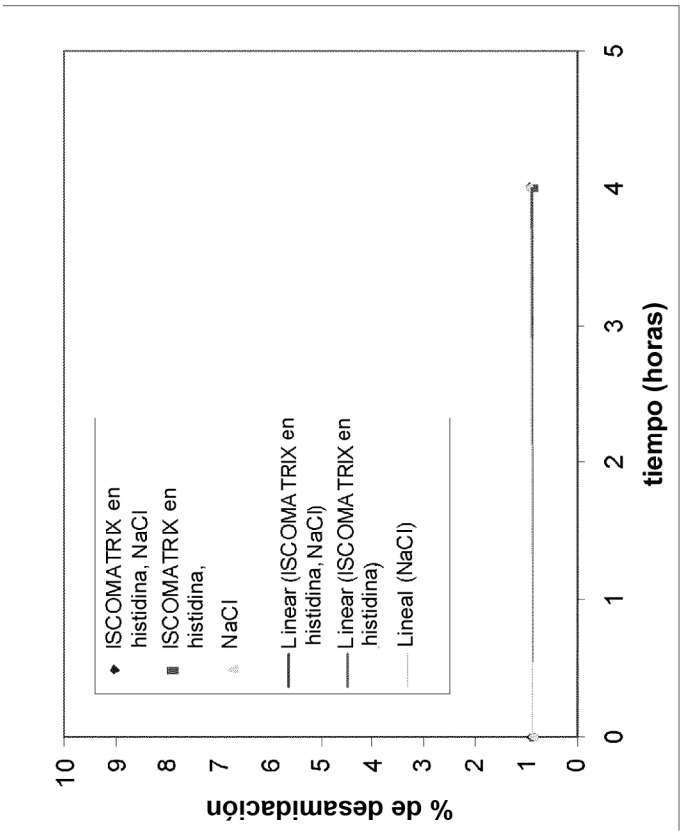


FIGURA 37D

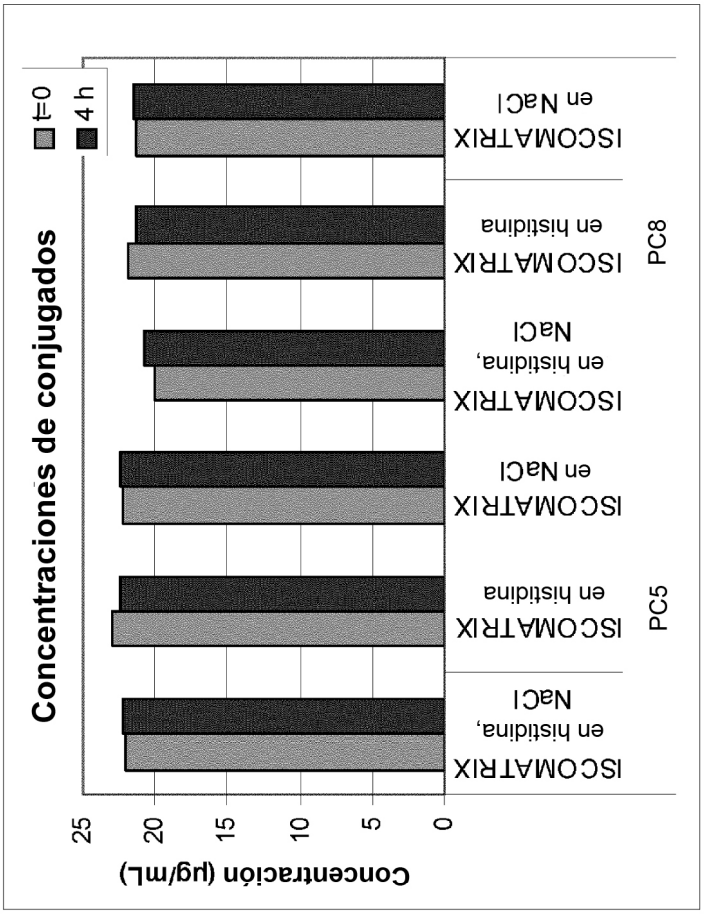


FIGURA 37C

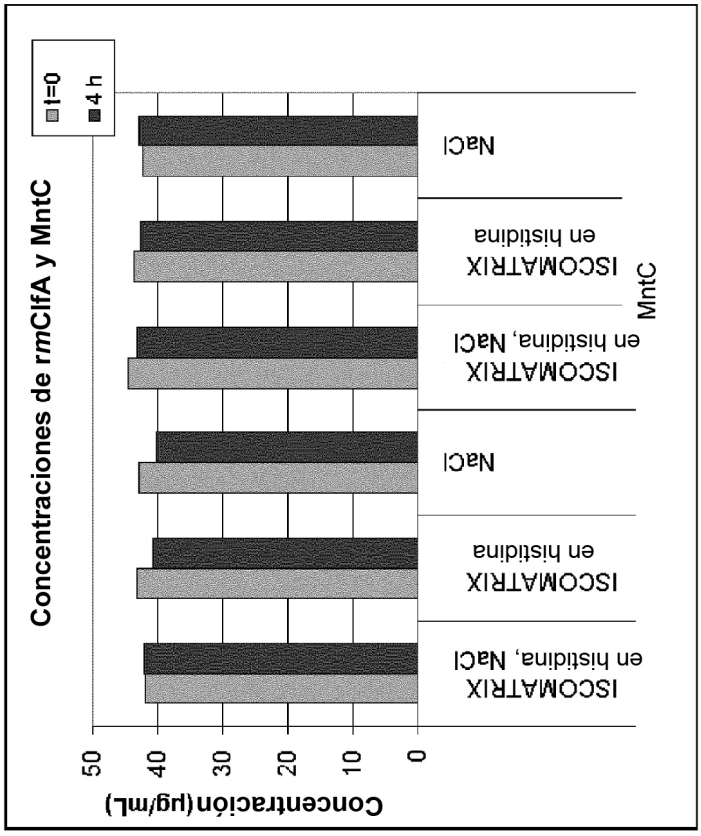


FIGURA 38A

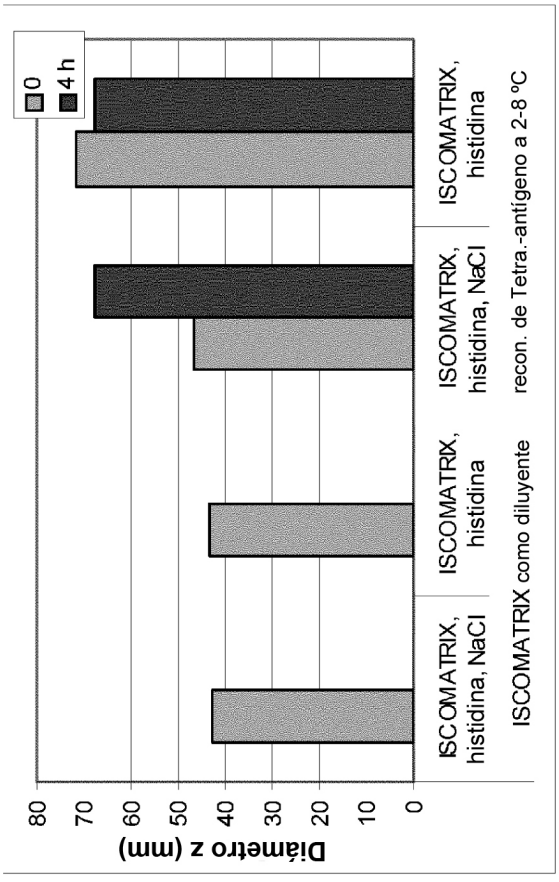


FIGURA 38B

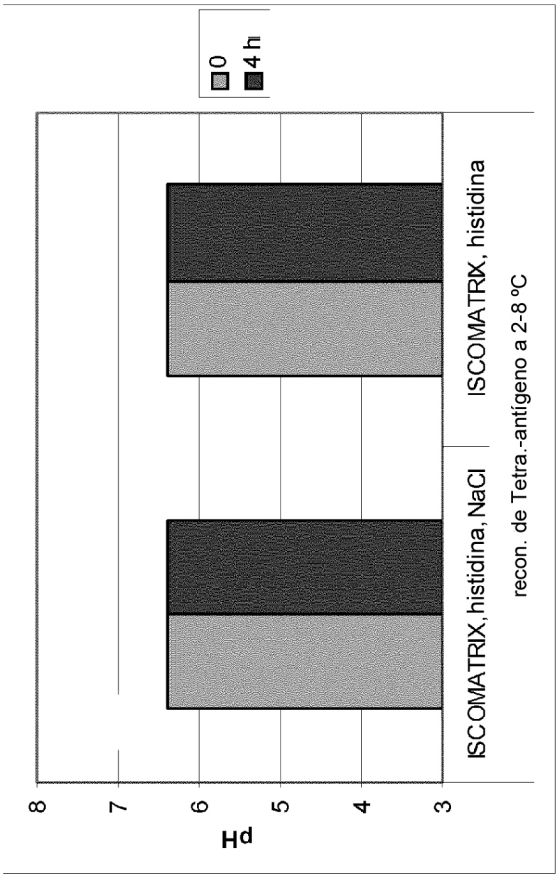


FIGURA 39A Alineación de ClfA

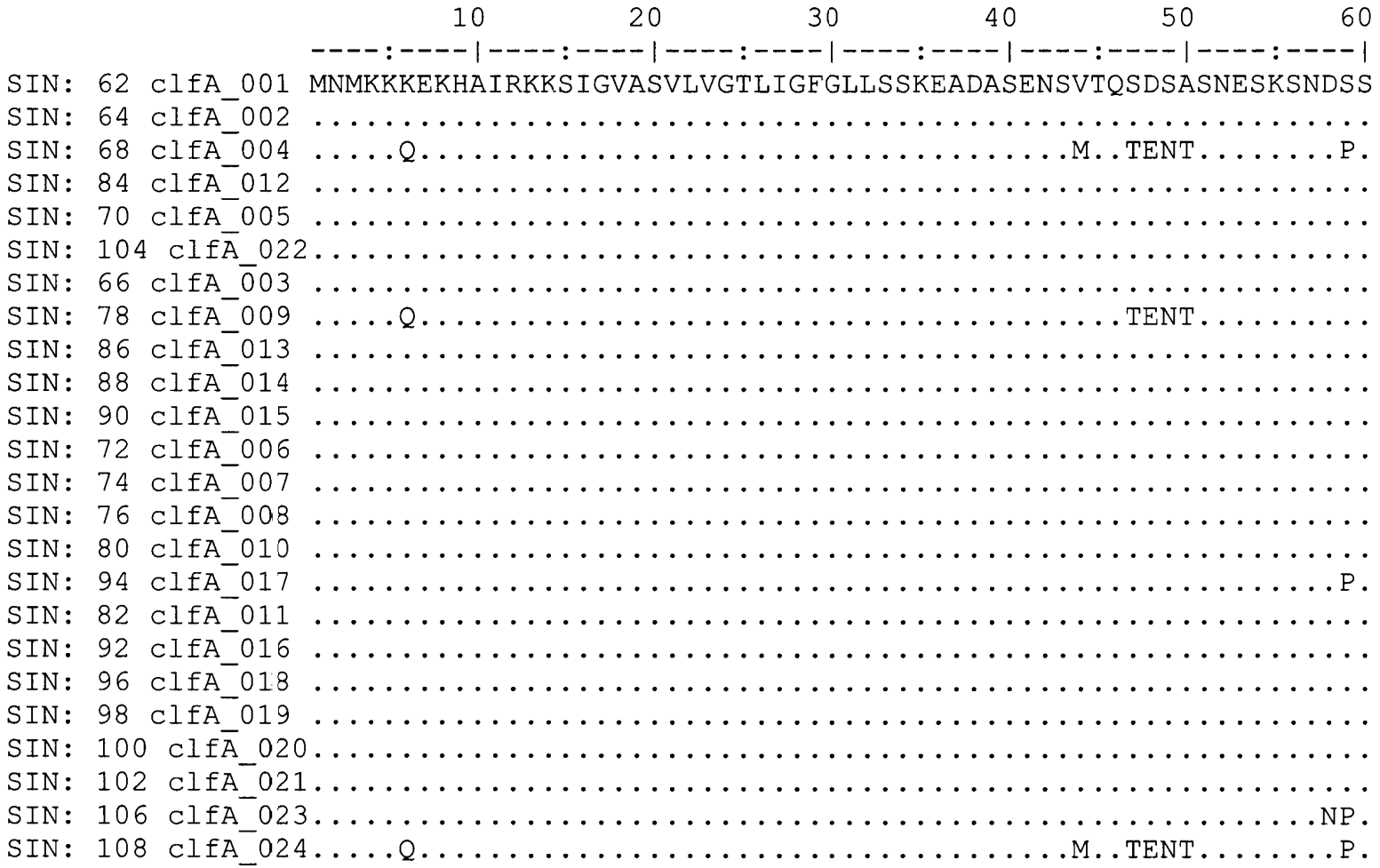


FIGURA 39B Alineación de ClfA

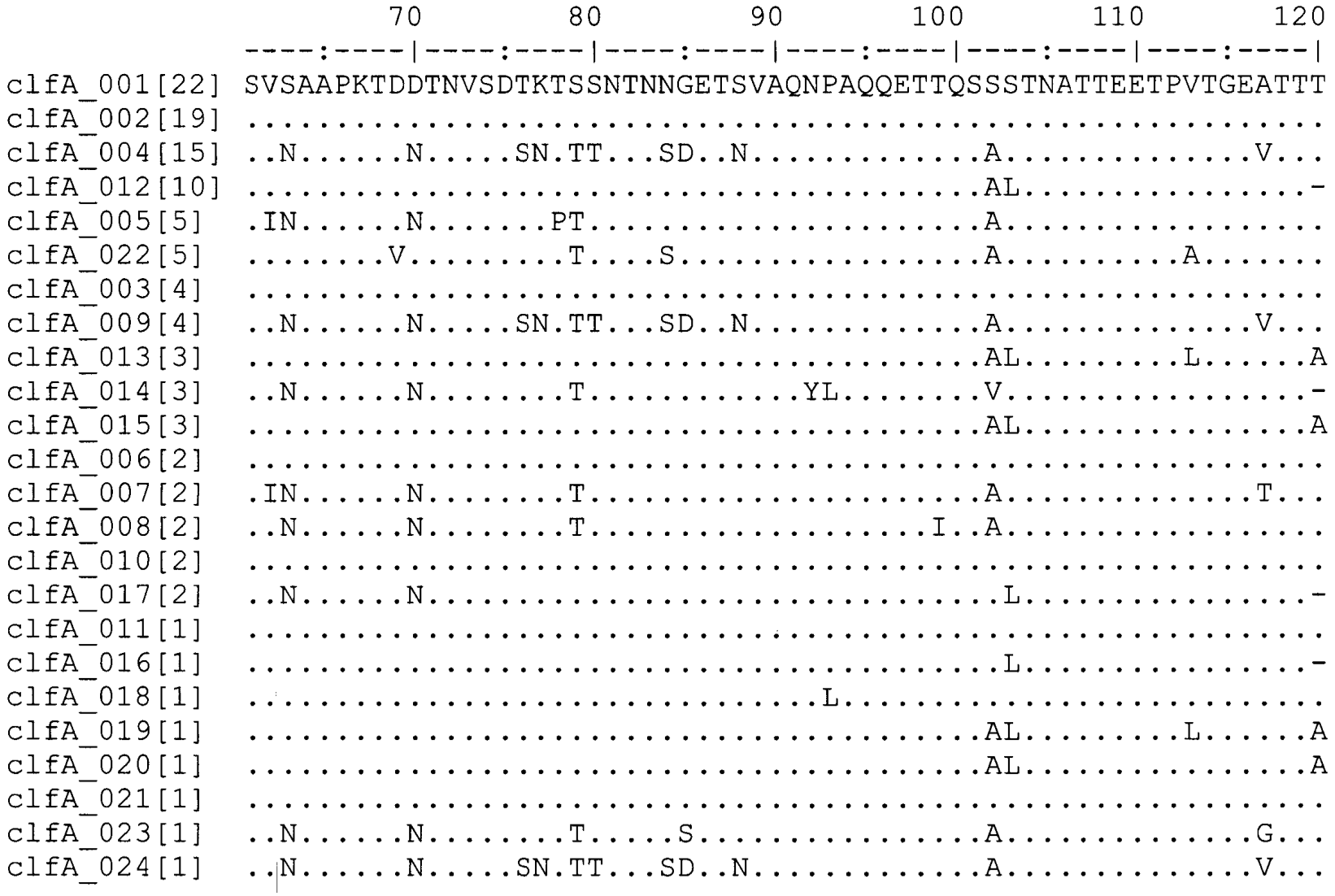


FIGURA 39C Alineación de ClfA

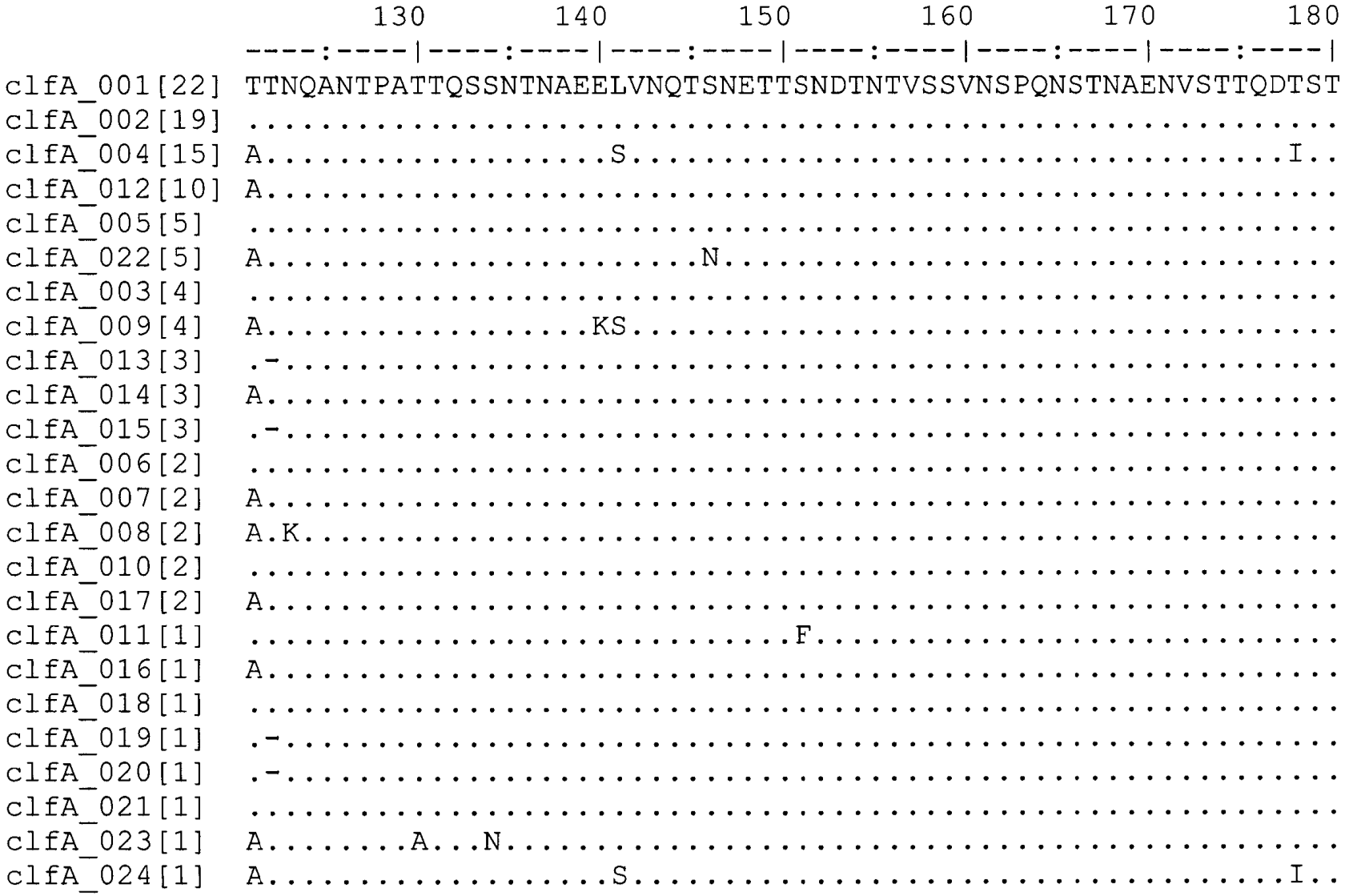


FIGURA 39D Alineación de ClfA

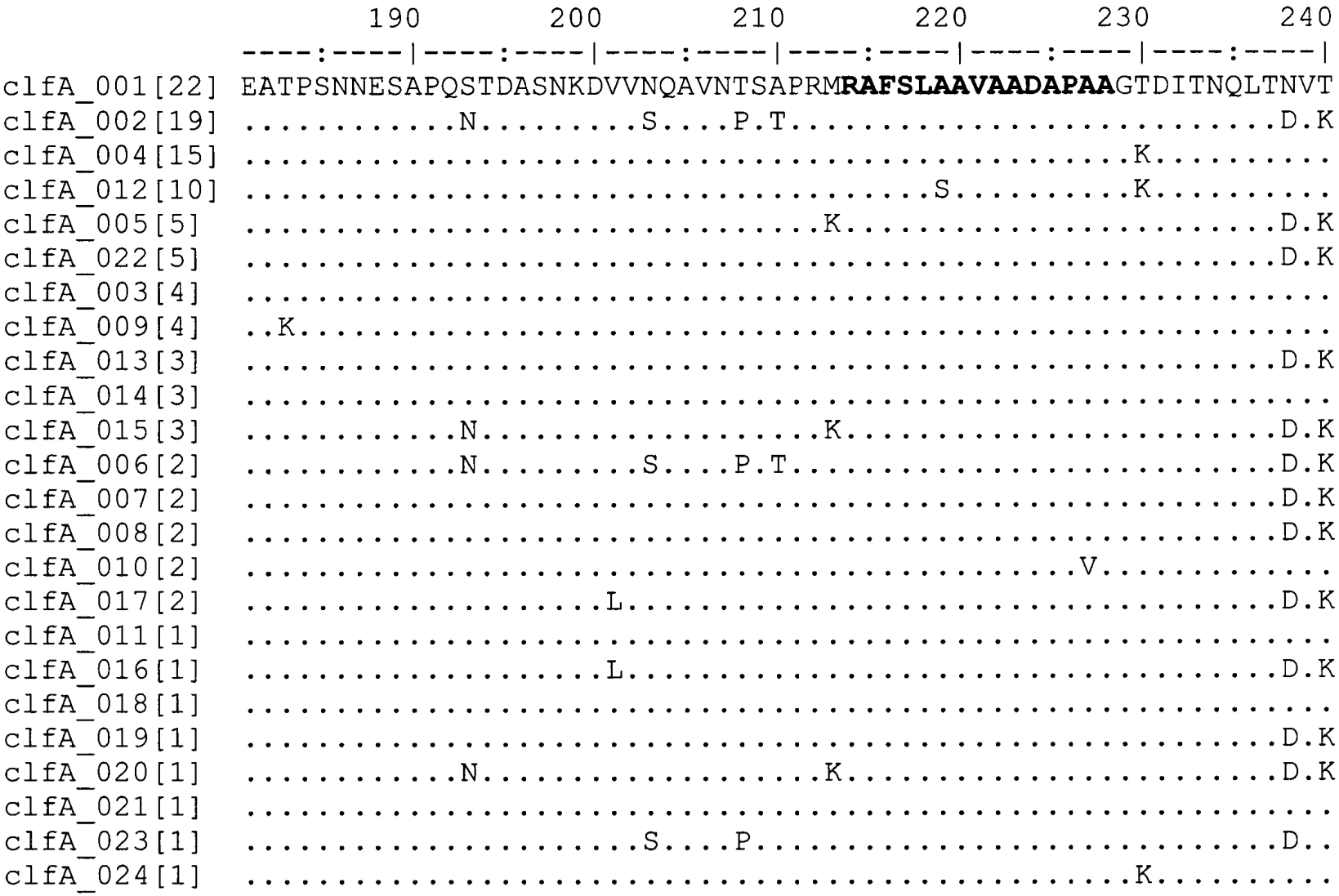


FIGURA 39E Alineación de ClfA

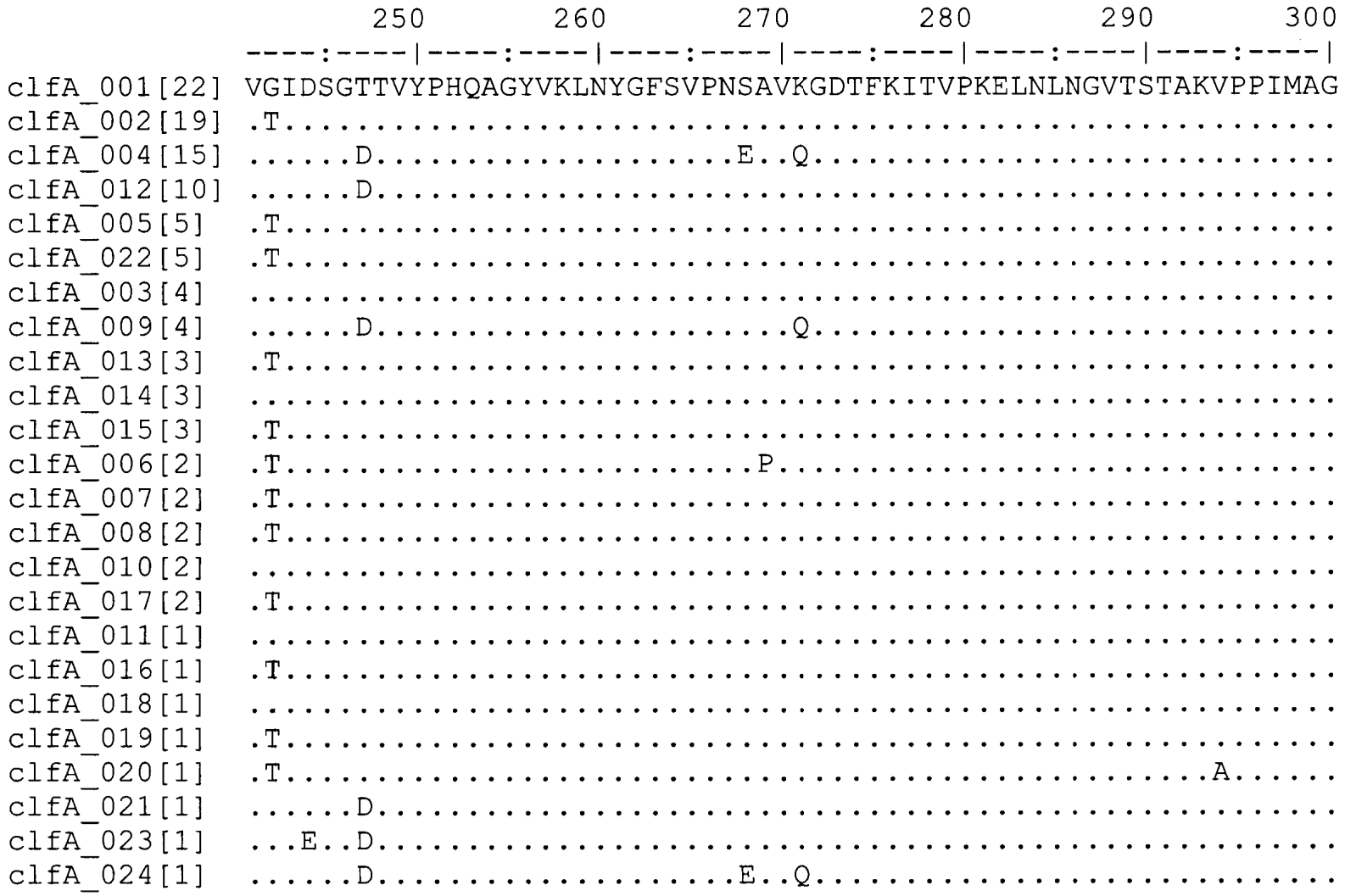


FIGURA 39F Alineación de ClfA

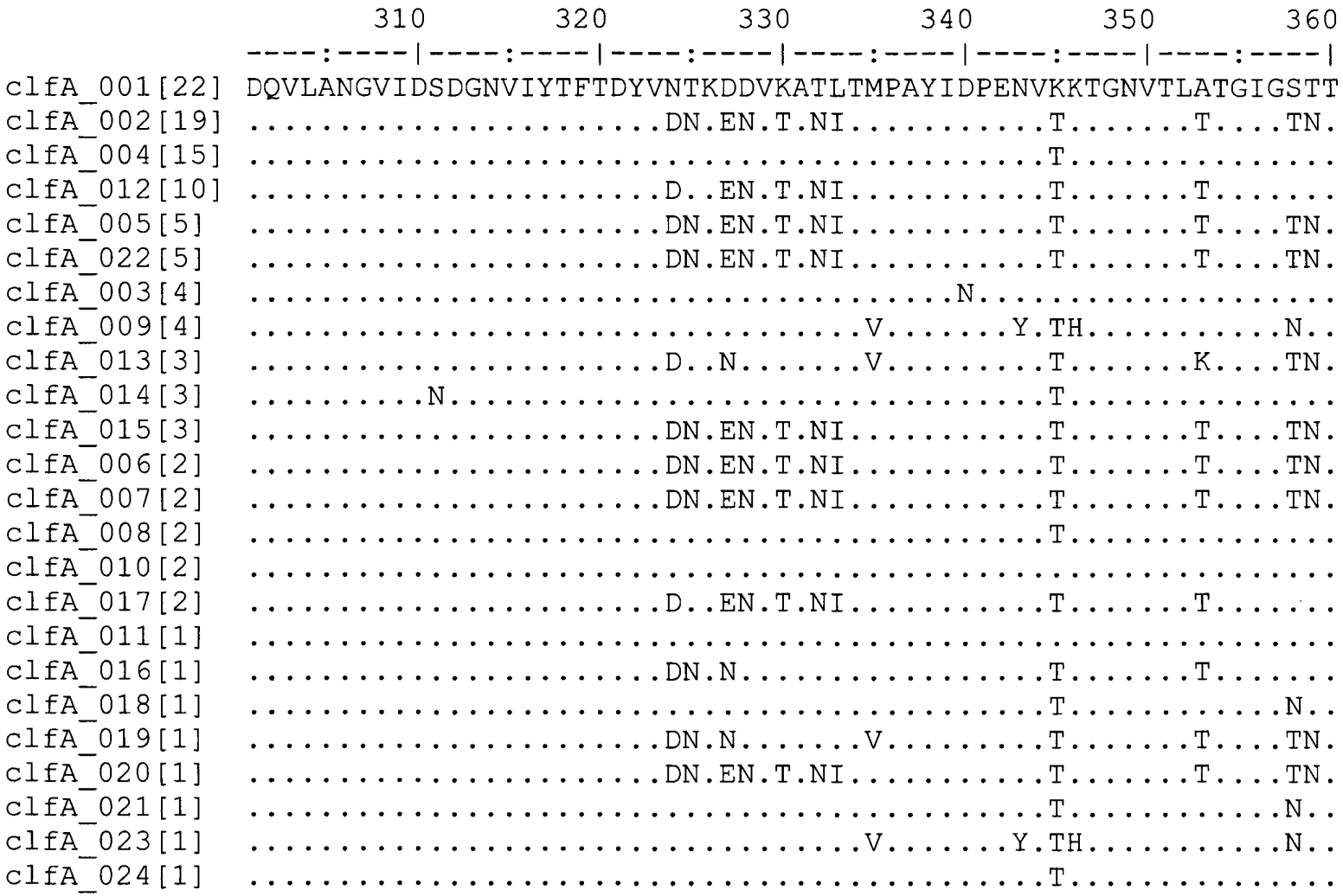


FIGURA 39G Alineación de ClfA

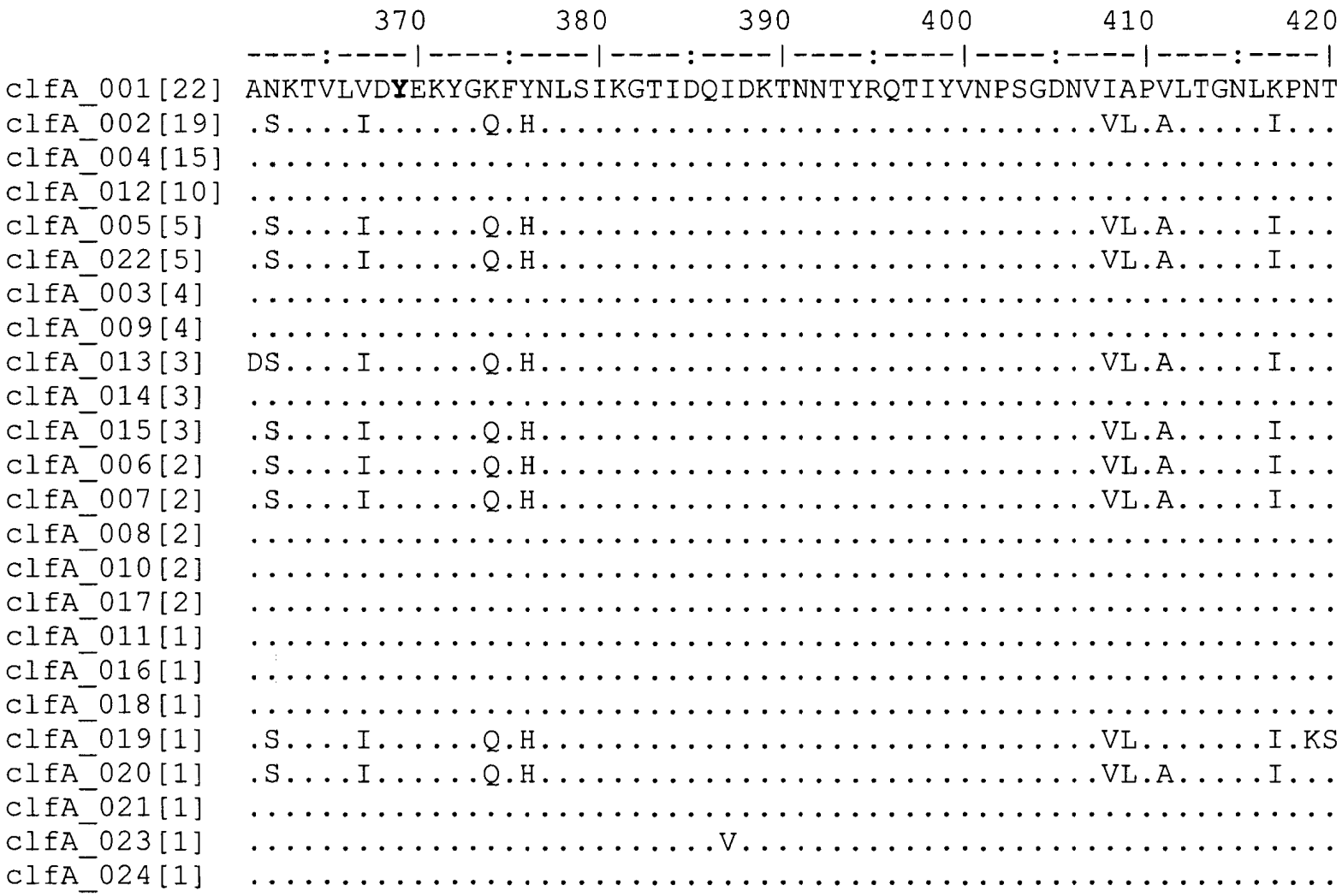


FIGURA 39H Alineación de ClfA

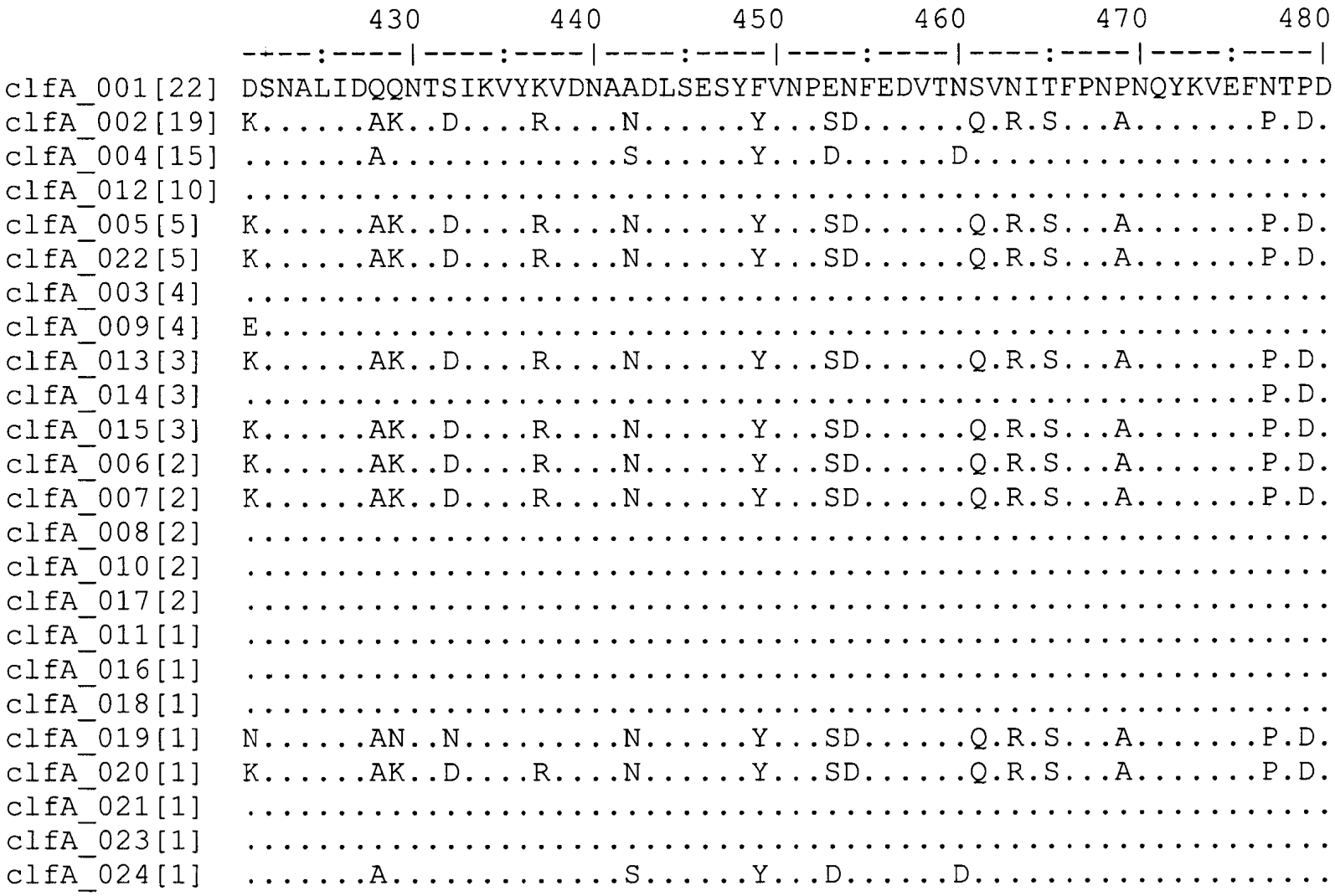


FIGURA 39I Alineación de ClfA

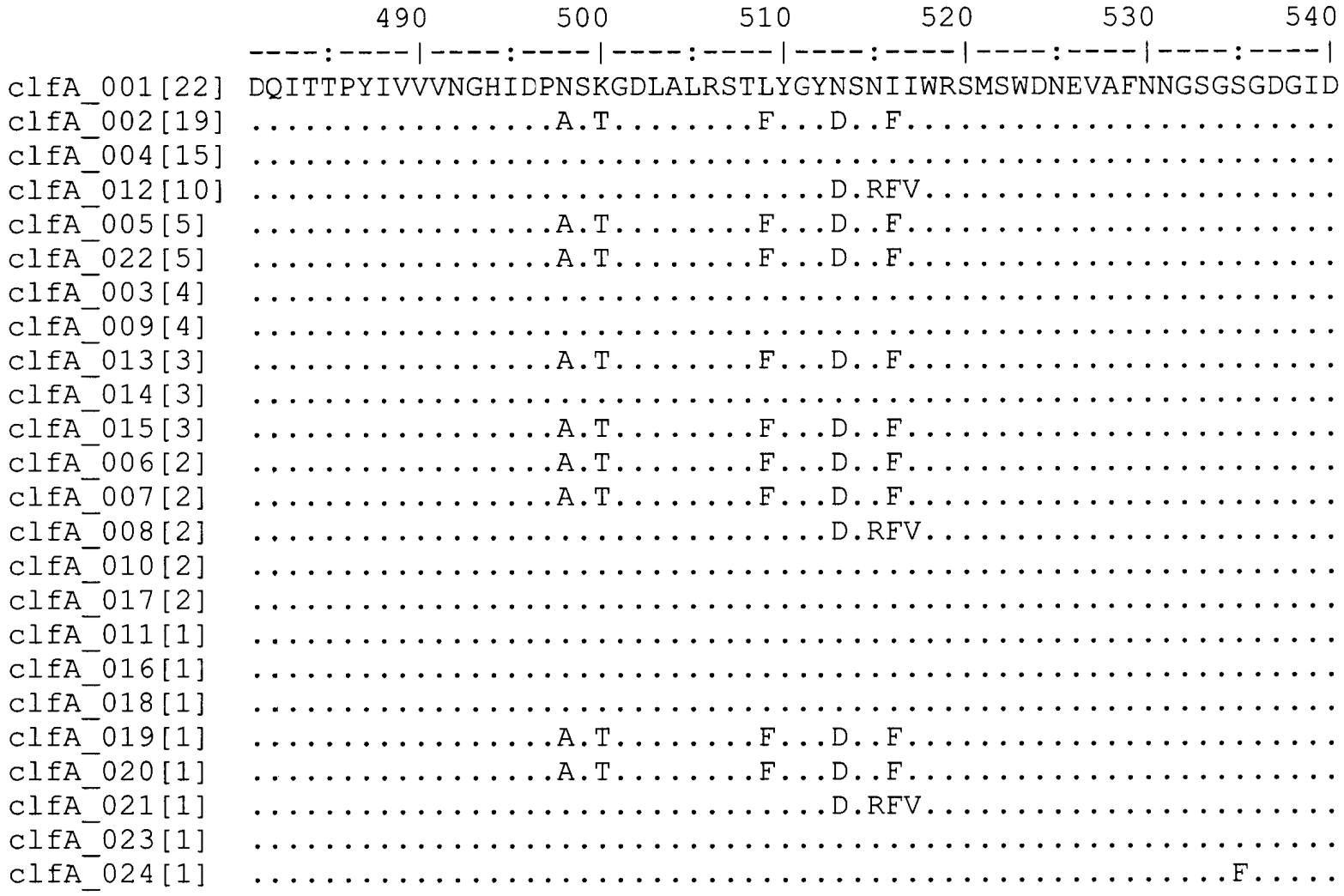


FIGURA 39J **Alineación de ClfA**

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

FIGURE 40A **Alineación de ClfB**

```
                    10        20        30        40        50        60
                    ----:----|----:----|----:----|----:----|----:----|
                    LKKRIDYLSNKQNKYSIRRFTVGTTSVIVGATILFGIGNHQAQASEQSNDTTQSSKNNAS
SIN: 26 clfB_006    ..........R.................................................
SIN: 28 clfB_007    ..........R.................................................
SIN: 32 clfB_009    ..........R.................................................
SIN: 18 clfB_002    ..........R.................................................
SIN: 54 clfB_021    ..........R.................................................
SIN: 34 clfB_010    ..........R.................................................
SIN: 36 clfB_011    ..........R.................................................
SIN: 30 clfB_008    ..........R.................................................
SIN: 16 clfB_001    ..........R.................................................
SIN: 20 clfB_003    ..........R.................................................
SIN: 22 clfB_004    ..........R.................................................
SIN: 24 clfB_005    ..........R.................................................
SIN: 38 clfB_013    ..........R.................................................
SIN: 40 clfB_014    ..........R.................................................
SIN: 42 clfB_015    ..........R.................................................
SIN: 44 clfB_016    ..........R.................................................
SIN: 46 clfB_017    ..........R.................................................
SIN: 48 clfB_018    ..........R.................................................
SIN: 50 clfB_019    ..........R.................................................
SIN: 52 clfB_020    ..........R.................................................
SIN: 56 clfB_022    ..........R.................................................
SIN: 58 clfB_023    ..........R.................................................
SIN: 60 clfB_024    ..........R.................................................
```

FIGURA 40B Alineación de ClfB

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

FIGURA 40C Alineación de ClfB

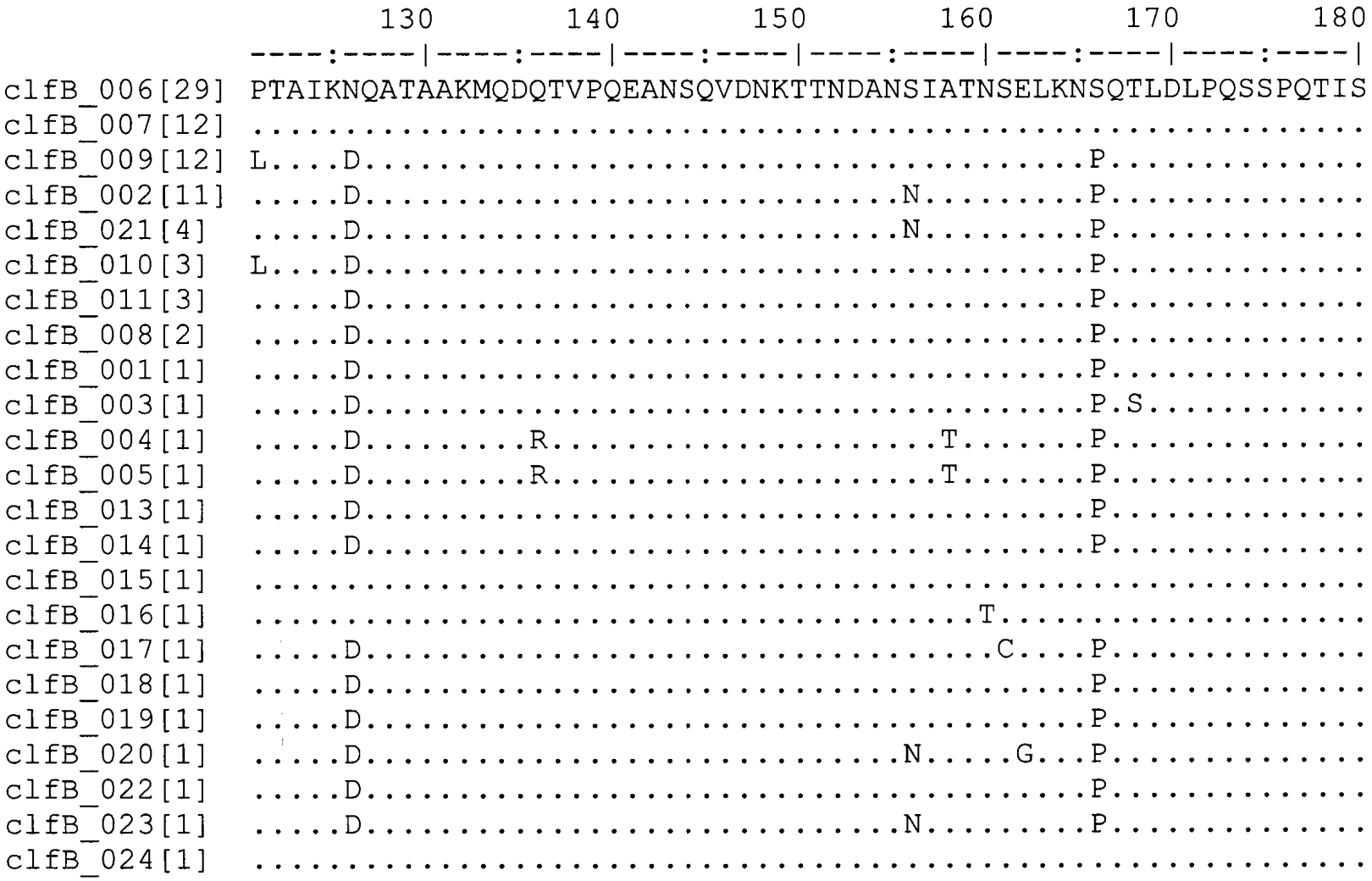


FIGURA 40D Alineación de ClfB

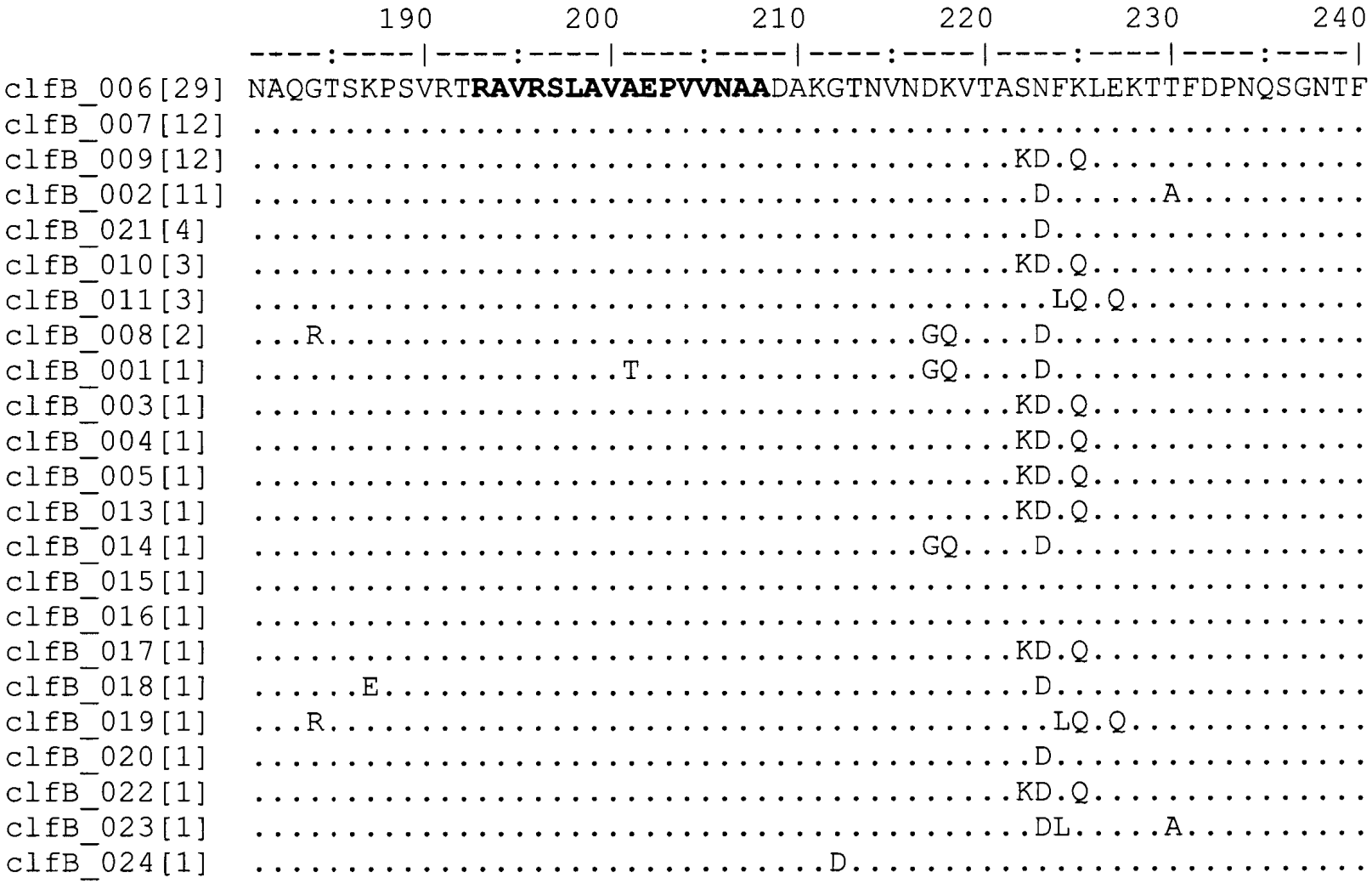


FIGURA 40E **Alineación de ClfB**

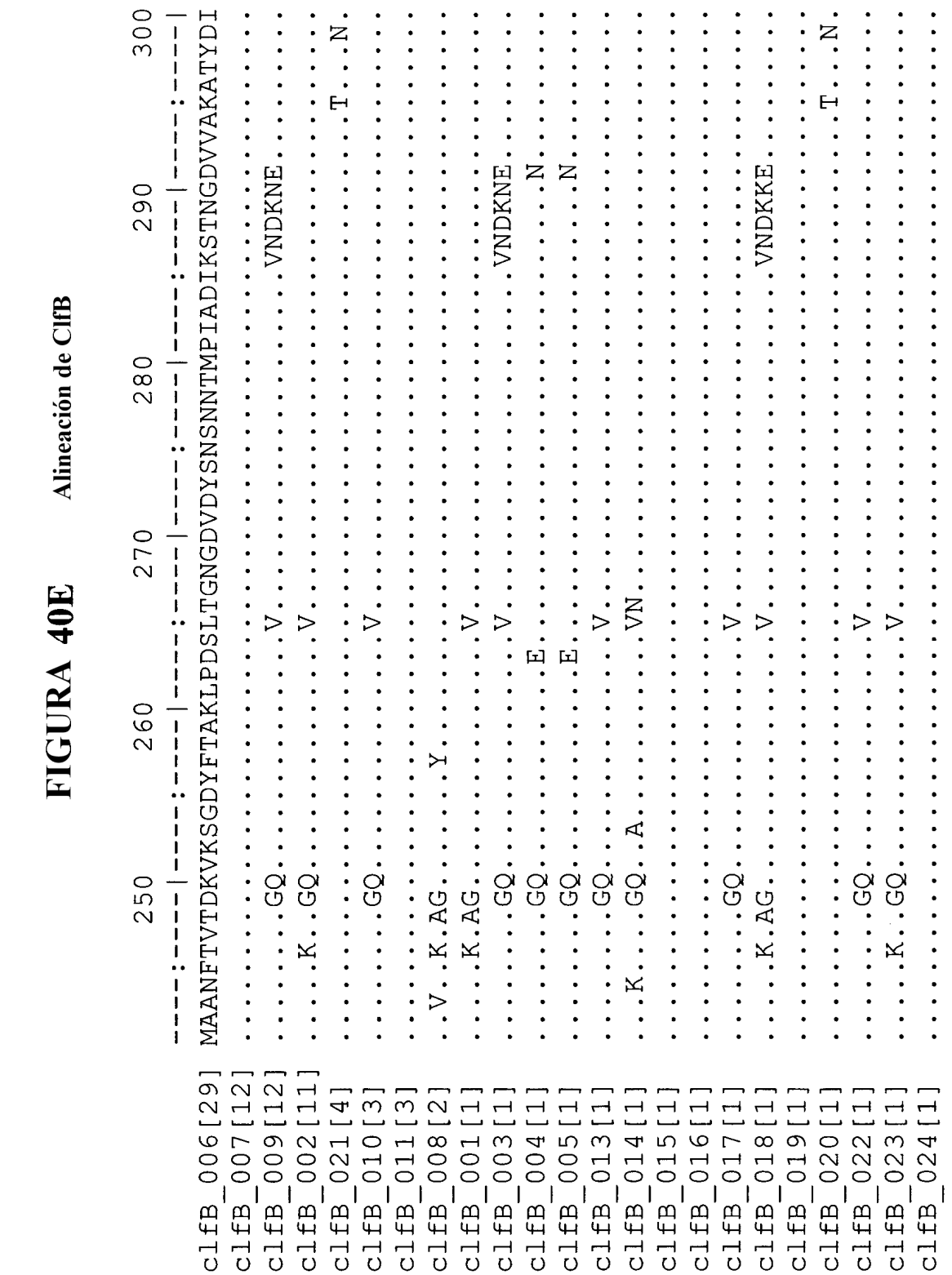


FIGURA 40F **Alineación de ClfB**

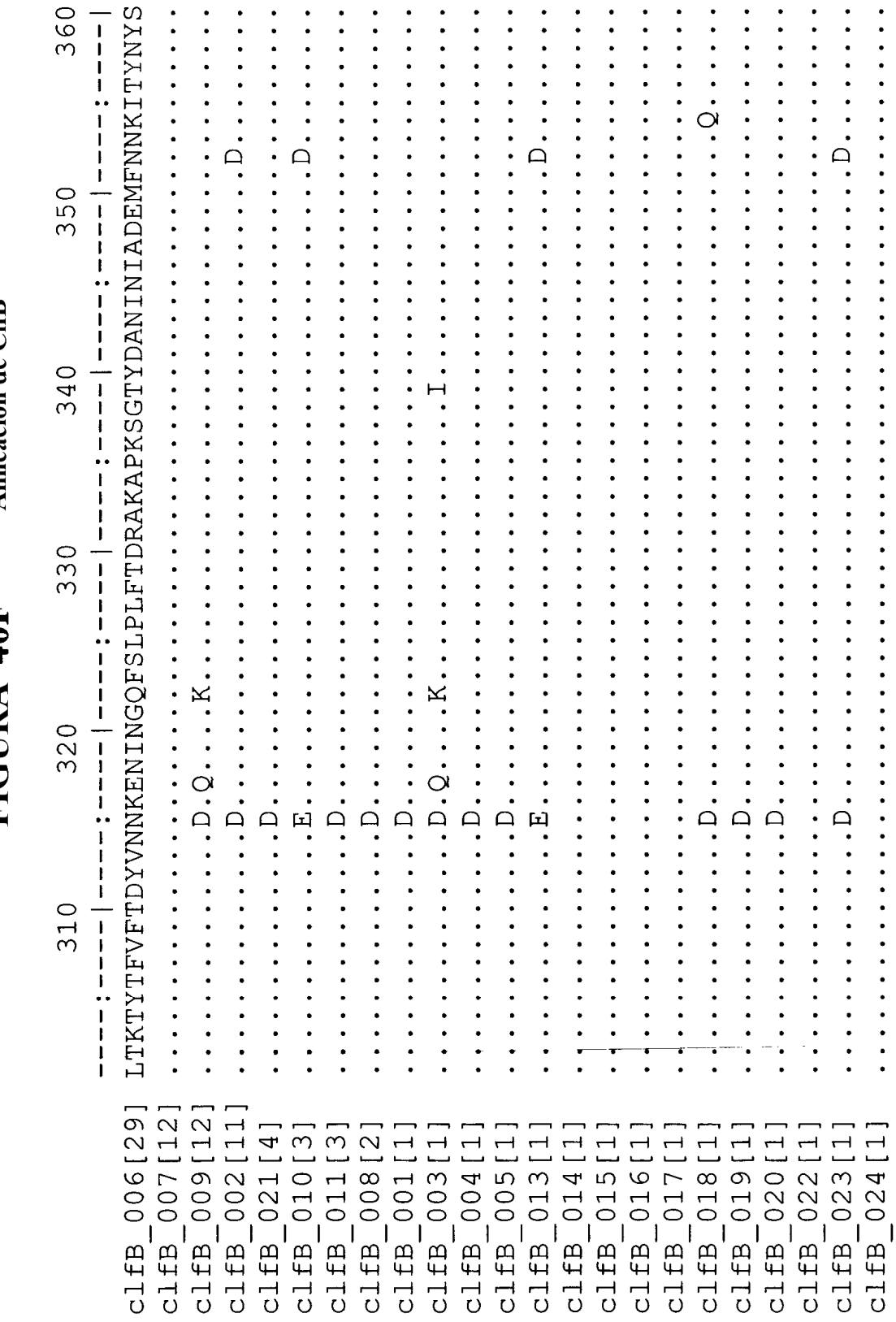


FIGURA 40G Alineación de ClfB

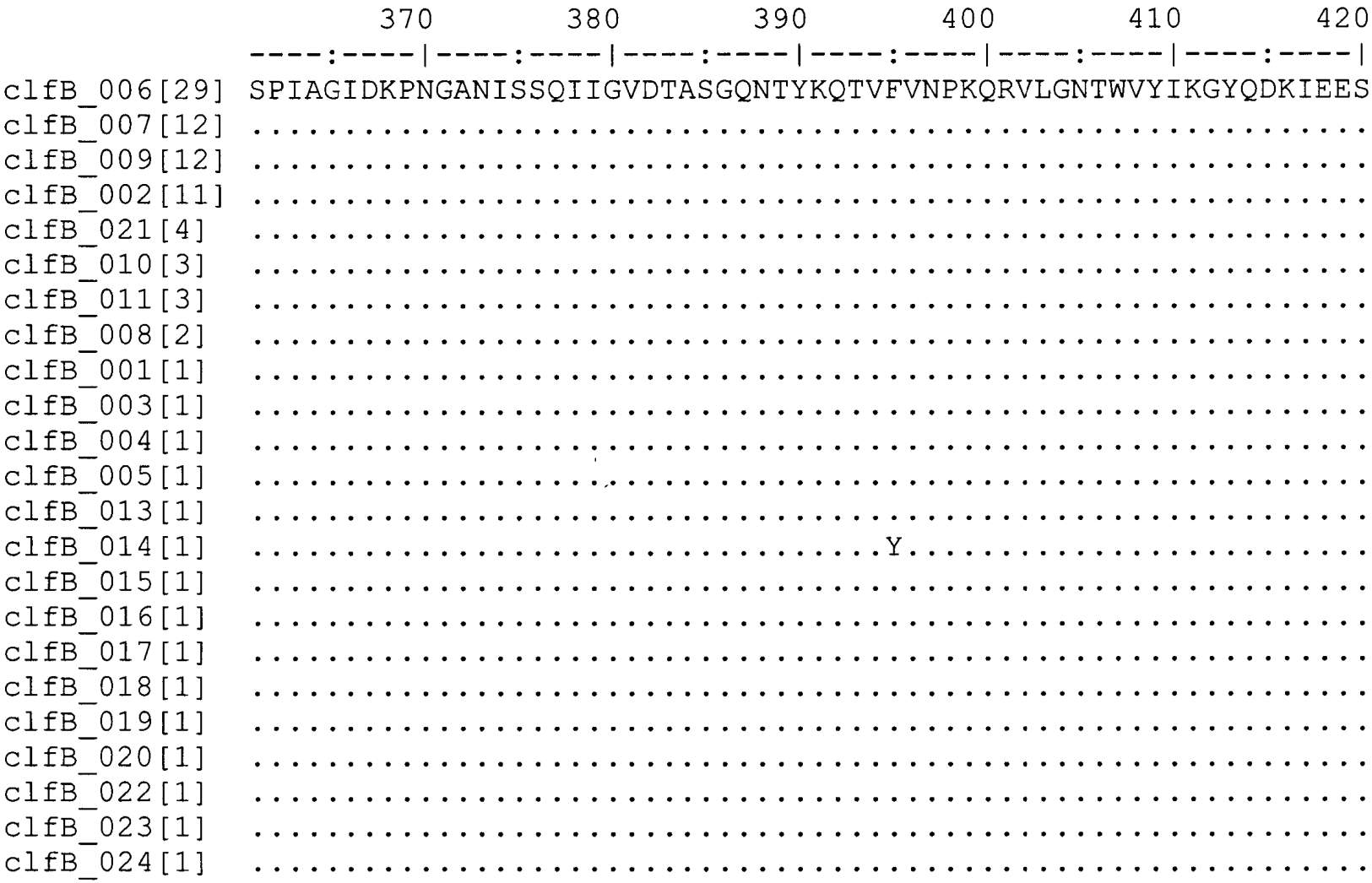
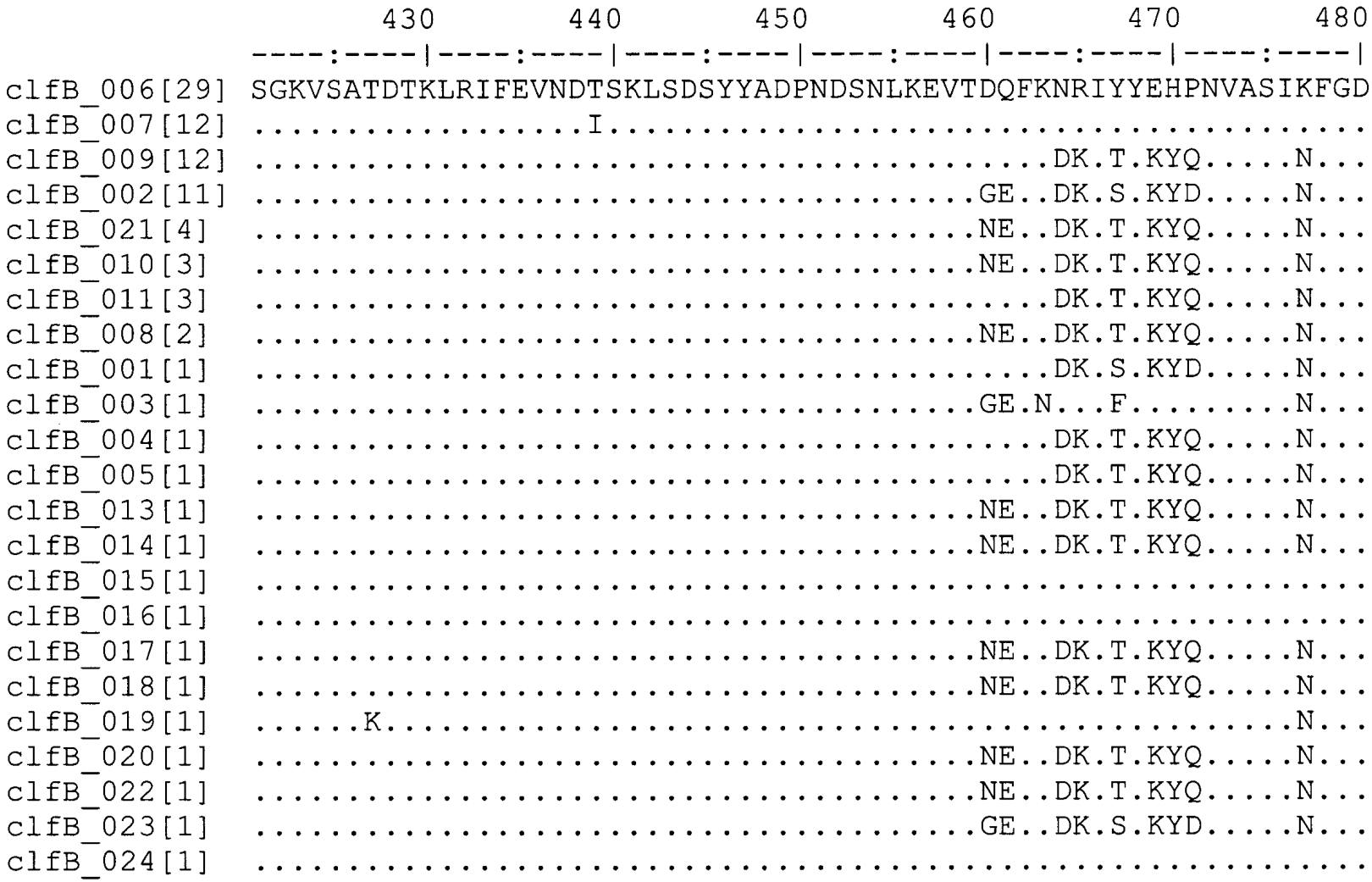


FIGURA 40H Alineación de ClfB



ES 2 769 425 T3

FIGURA 40I Alineación de ClfB

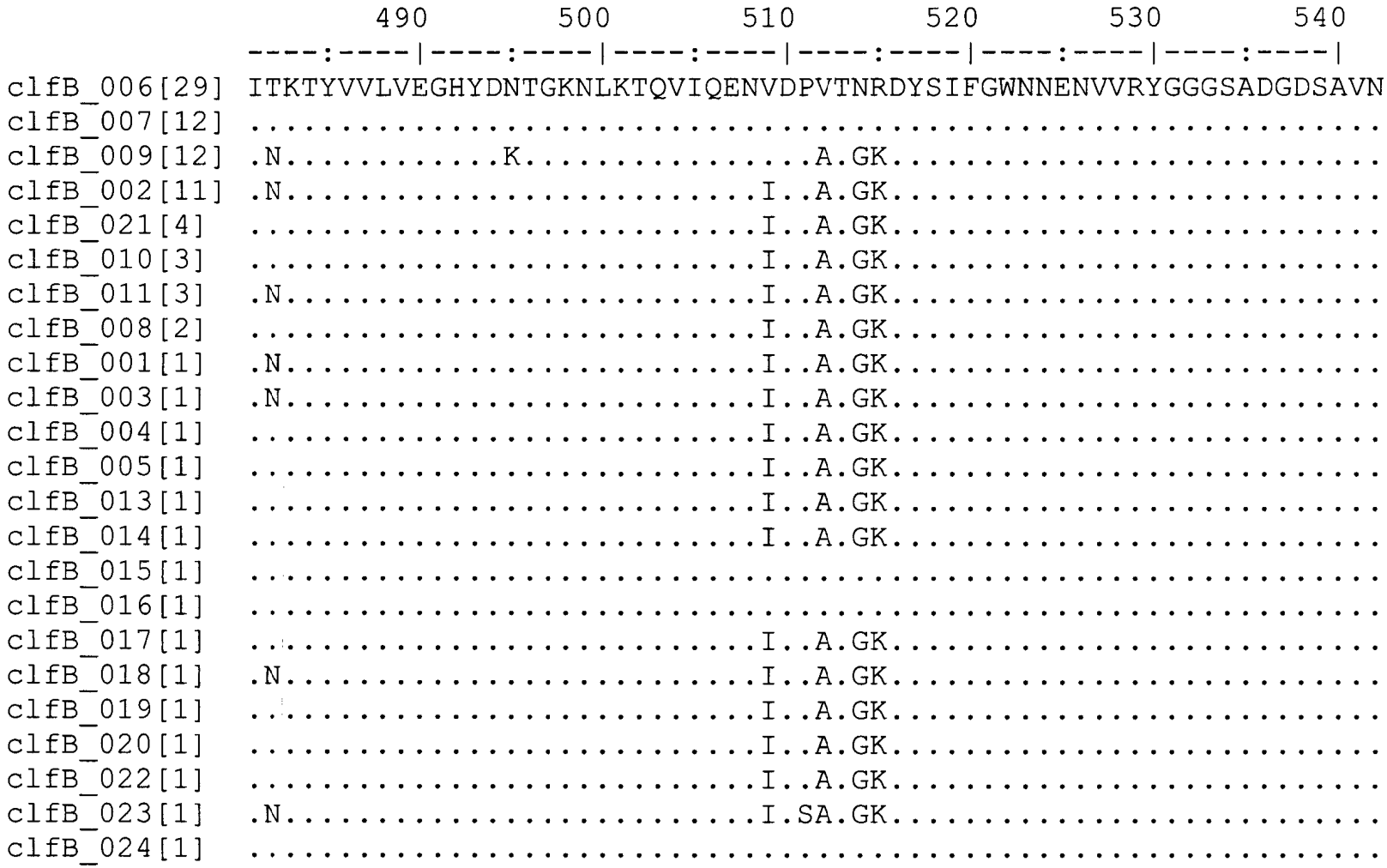


FIGURA 41A Alineación de MntC

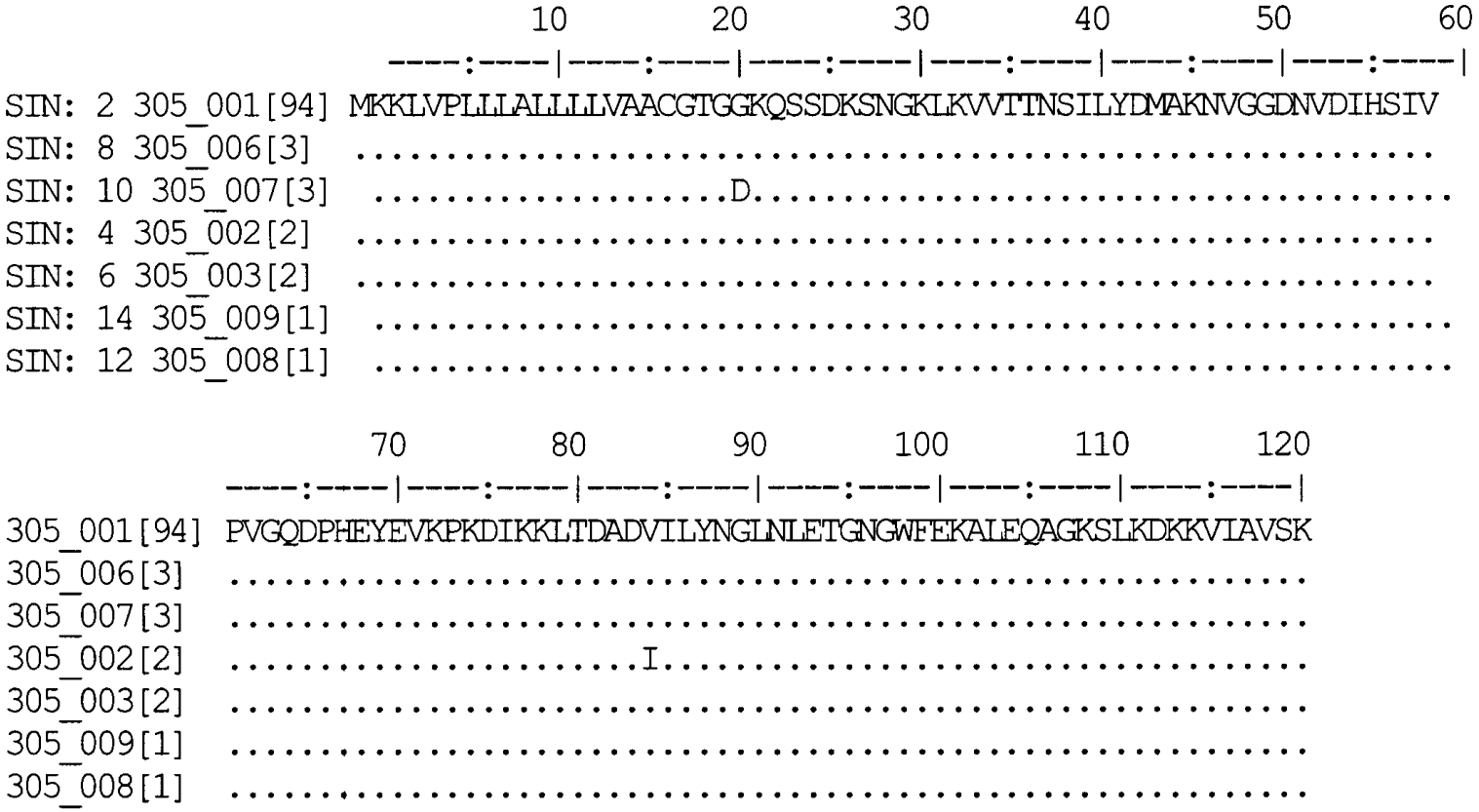


FIGURA 41B Alineación de MntC

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

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

FIGURA 41C Alineación de MntC

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

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

FIGURA 42 **Cepas de ClfB y listados de secuencias**

Cepa de ejemplo	ADN-ClfB	SEQ ID NO:	Proteína-ClfB	SEQ ID NO:	% de identidad al antígeno
PFESA0286	clfB_001-1	15	clfB_001	16	95
PFESA0159	clfB_002-1	17	clfB_002	18	95
RF122	clfB_003-1	19	clfB_003	20	94
PFESA0271	clfB_004-1	21	clfB_004	22	95
PFESA0081	clfB_005-1	23	clfB_005	24	95
PFESA0080	clfB_006-1	25	clfB_006	26	100
PFESA0270	clfB_007-1	27	clfB_007	28	99
PFESA0269	clfB_008-1	29	clfB_008	30	95
PFESA0145	clfB_009-1	31	clfB_009	32	94
PFESA0069	clfB_010-1	33	clfB_010	34	95
PFESA0002	clfB_011-1	35	clfB_011	36	96
PFESA0128	clfB_013-1	37	clfB_013	38	96
PFESA0129	clfB_014-1	39	clfB_014	40	95
PFESA0136	clfB_015-1	41	clfB_015	42	99
PFESA0139	clfB_016-1	43	clfB_016	44	99
PFESA0140	clfB_017-1	45	clfB_017	46	96
PFESA0141	clfB_018-1	47	clfB_018	48	94
PFESA0144	clfB_019-1	49	clfB_019	50	97
PFESA0150	clfB_020-1	51	clfB_020	52	96
PFESA0152	clfB_021-1	53	clfB_021	54	96
PFESA0156	clfB_022-1	55	clfB_022	56	96
PFESA0163	clfB_023-1	57	clfB_023	58	94
PFESA0211	clfB_024-1	59	clfB_024	60	99

FIGURA 43 **Cepas de MntC y listados de secuencias**

Cepa	ADN-MntC	SEQ ID NO:	Proteína-MntC	SEQ ID NO:	% de identidad al antígeno
PFESA0129	MntC_001-1	1	MntC_001	2	99
PFESA0142	MntC_002-1	3	MntC_002	4	99
PFESA0139	MntC_003-1	5	MntC_003	6	99
PFESA0286	MntC_006-1	7	MntC_006	8	99
PFESA0136	MntC_007-1	9	MntC_007	10	99
PFESA0150	MntC_008-1	11	MntC_008	12	99
PFESA0153	MntC_009-1	13	MntC_009	14	99