

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2010.04.05**

(30) Prioridade(s): **2009.04.03 US 166432 P**
2009.08.28 US 237956 P
2009.12.18 US 287996 P

(43) Data de publicação do pedido: **2012.02.08**

(45) Data e BPI da concessão: **2015.12.16**
063/2016

(73) Titular(es):

UNIVERSITY OF CHICAGO
5801 S. ELLIS AVENUE CHICAGO, IL 60637 US

(72) Inventor(es):

OLAF SCHNEEWIND US
ALICE CHENG US
DOMINIQUE MISSIAKAS US
HWAN KIM US

(74) Mandatário:

FERNANDO ANTÓNIO FERREIRA MAGNO
AV. 5 DE OUTUBRO, Nº 146, 7º ANDAR 1050-061 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÕES E MÉTODOS RELACIONADOS COM VARIANTES DA PROTEÍNA A (SPA)**

(57) Resumo:

SÃO DIVULGADOS MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA TRATAR OU PREVENIR UMA INFEÇÃO BACTERIANA POR ESTAFILOCOCOS, UTILIZANDO UMA VARIANTE DA PROTEÍNA A (SPA) NÃO TOXIGÉNICA.

RESUMO

**"Composições e métodos relacionados com variantes
da proteína A (SPA)"**

São divulgados métodos e composições para tratar ou prevenir uma infecção bacteriana por estafilococos, utilizando uma variante da proteína A (SpA) não toxigénica.

DESCRIÇÃO

"Composições e métodos relacionados com variantes da proteína A (SPA)"

ANTECEDENTES DO INVENTO

I. CAMPO DO INVENTO

O presente invento refere-se, de uma forma geral, aos campos da imunologia, da microbiologia e da patologia. Mais particularmente, refere-se a métodos e composições envolvendo variantes da proteína A bacteriana, que podem ser usados para ativar uma resposta imune contra as bactérias.

II. ANTECEDENTES

O número de infeções adquiridas tanto na comunidade como nos hospitais aumentou em anos recentes com o uso acrescido de dispositivos intravasculares. As infeções adquiridas nos hospitais (nosocomiais) são uma causa importante de morbidade e mortalidade, mais particularmente nos Estados Unidos, onde afetam mais de 2 milhões de doentes anualmente. As infeções mais frequentes são as infeções do trato urinário (33% das infeções), seguidas da pneumonia (15,5%), das infeções no local cirúrgico (14,8%) e das infeções primárias da corrente sanguínea (13%) (Emorl and Gaynes, 1993).

Os principais organismos patogénicos nosocomiais incluem *Staphylococcus aureus*, os estafilococos coagulase-negativos (principalmente *Staphylococcus epidermidis*), as espécies de enterococos, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Embora estes organismos patogénicos causem aproximadamente o mesmo número de infeções, a gravidade das perturbações que podem produzir combinada com a frequência de isolados resistentes aos antibióticos faz pender esta classificação na direção de *S. aureus* e *S. epidermidis* como sendo os organismos patogénicos nosocomiais mais significativos.

Os estafilococos podem causar uma grande variedade de doenças nos seres humanos e noutros animais, quer através da produção de toxinas quer por invasão. As toxinas

estafilocócicas também são uma causa comum de intoxicação alimentar, uma vez que as bactérias podem crescer em alimentos inadequadamente armazenados.

O *Staphylococcus epidermidis* é um parasita cutâneo normal, que é também um importante organismo patogénico oportunista responsável por infeções de dispositivos médicos comprometidos e por infeções nos locais de cirurgias. Os dispositivos médicos infetados por *S. epidermidis* incluem os pacemakers cardíacos, os shunts do fluido cerebrospinal, os cateteres de diálise peritoneal contínua ambulatoria, os dispositivos ortopédicos e as válvulas cardíacas protésicas.

O *Staphylococcus aureus* é a causa mais comum de infeções nosocomiais com uma morbidade e mortalidade significativas. É a causa de alguns casos de osteomielite, endocardite, artrite séptica, pneumonia, abscessos e síndrome de choque tóxico. O *S. aureus* pode sobreviver em superfícies secas, aumentando a possibilidade de transmissão. Qualquer infeção por *S. aureus* pode causar a síndrome da pele escaldada estafilocócica, que é uma reação cutânea à exotoxina absorvida na corrente sanguínea. Também pode causar um tipo de septicemia denominado piemia que pode ser fatal. De forma problemática, o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) tornou-se uma causa principal das infeções adquiridas nos hospitais.

As infeções por *S. aureus* e *S. epidermidis* são tipicamente tratadas com antibióticos, em que a penicilina é o fármaco de eleição, ao passo que a vancomicina é utilizada para os isolados resistentes à meticilina. A percentagem de estirpes estafilocócicas que exibem uma resistência aos antibióticos de largo espectro tem-se tornado cada vez mais prevalente, constituindo uma ameaça para uma terapêutica antimicrobiana eficaz. Além disso, o surgimento recente de uma estirpe de *S. aureus* resistente à vancomicina despertou o medo de que estejam a surgir e a disseminar-se estirpes de MRSA para as quais não existe uma terapêutica eficaz.

Uma alternativa ao tratamento das infeções estafilocócicas com antibióticos, que utiliza anticorpos dirigidos contra antígenos estafilocócicos, encontra-se em investigação. Esta terapêutica envolve a administração de

antissoros policlonais (W000/15238, W000/12132) ou o tratamento com anticorpos monoclonais contra o ácido lipoteicóico (W098/57994).

Uma abordagem alternativa seria a utilização da vacinação ativa para gerar uma resposta imune contra os estafilococos. O genoma de *S. aureus* foi sequenciado e muitas das sequências codificantes foram identificadas (W002/094868, EP0786519), o que pode conduzir à identificação de antigénios potenciais. O mesmo acontece com *S. epidermidis* (W001/34809). Como refinamento desta abordagem, outros autores identificaram proteínas que são reconhecidas por soros hiperimunes de doentes que tiveram uma infeção estafilocócica (W001/98499, W002/059148).

O *S. aureus* segrega uma pletora de fatores de virulência para o meio extracelular (Archer, 1998; Dinges *et al.*, 2000; Foster, 2005; Shaw *et al.*, 2004; Sibbald *et al.*, 2006). Tal como acontece com a maioria das proteínas segregadas, estes fatores de virulência são translocados pela maquinaria Sec através da membrana plasmática. As proteínas segregadas pela maquinaria Sec transportam um péptido *leader* N-terminal que é removido pela peptidase *leader* uma vez a preproteína engrenada no translocão Sec (Dalbey and Wickner, 1985; van Wely *et al.*, 2001). Uma análise recente do genoma sugere que o filo Actinobacteria e membros do filo Firmicutes codificam um sistema de secreção adicional que reconhece um subconjunto de proteínas de uma forma independente da maquinaria Sec (Pallen, 2002). O ESAT-6 (do inglês *early secreted antigen target 6 kDa*) e o CFP-10 (do inglês *culture filtrate antigen 10 kDa*) de *Mycobacterium tuberculosis* representam os primeiros substratos deste novo sistema de secreção denominado ESX-1 ou Snm em *M. tuberculosis* (Andersen *et al.*, 1995; Hsu *et al.*, 2003; Pym *et al.*, 2003; Stanley *et al.*, 2003). Em *S. aureus*, dois fatores idênticos a ESAT-6, designados por EsxA e EsxB, são segregados pela via Ess (do inglês *ESAT-6 secretion systems*) (Burts *et al.*, 2005).

A primeira geração de vacinas direcionadas contra *S. aureus* ou contra as exoproteínas que este produz tiveram um sucesso limitado (Lee, 1996). Persiste, assim, a necessidade de desenvolver vacinas eficazes contra as infeções

estafilocócicas. Composições adicionais para tratar as infeções estafilocócicas são também necessárias.

SUMÁRIO DO INVENTO

A proteína A (SpA) (SEQ ID NO:33), uma proteína de superfície de *Staphylococcus aureus* ancorada à parede celular, permite a fuga bacteriana às respostas imunes inata e adaptável. A proteína A liga-se às imunoglobulinas ao nível da sua porção Fc, interage com o domínio VH3 dos recetores das células B, estimulando de forma inapropriada a proliferação e a apoptose das células B, liga-se aos domínios A1 do fator de von Willebrand para ativar a coagulação intracelular e também se liga ao recetor 1 do TNF para contribuir para a patogénese da pneumonia estafilocócica. Devido ao facto de a proteína A capturar as imunoglobulinas e apresentar atributos tóxicos, a possibilidade de esta molécula de superfície funcionar como uma vacina nos seres humanos não foi pesquisada com rigor. Aqui, os inventores demonstram que as variantes da proteína A que já não são capazes de se ligar às imunoglobulinas, e que estão por isso desprovidas do seu potencial toxigénico, isto é, são não toxigénicas, estimulam respostas imunes humorais que protegem contra a doença estafilocócica.

O presente invento refere-se a um polipéptido isolado compreendendo uma proteína A (SpA) variante que possui (a) pelo menos duas substituições de aminoácidos que perturbam a ligação a Fc, compreendendo uma substituição de aminoácido em cada uma das posições de aminoácido 9 e 10 da SEQ ID NO:2 e (b) pelo menos duas substituições de aminoácidos que perturbam a ligação a VH3, compreendendo uma substituição de aminoácido em cada uma das posições de aminoácido 36 e 37 da SEQ ID NO:2 e (c) uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2.

Em determinadas concretizações, a variante da SpA é uma variante da SpA completa compreendendo um domínio A, B, C, D e E variante. Em determinados aspetos, a variante da SpA compreende ou consiste na sequência de aminoácidos que é 80, 90, 95, 98, 99 ou 100% idêntica à sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 34. Noutras concretizações, a variante da SpA compreende um segmento da SpA. O segmento da SpA pode compreender pelo menos ou não mais de 1, 2, 3, 4, 5 ou mais

domínios de ligação a IgG. Os domínios de ligação a IgG podem ser pelo menos ou não mais de 1, 2, 3, 4, 5 ou mais domínios A, B, C, D ou E variantes. Em certos aspetos, a variante da SpA compreende pelo menos ou não mais de 1, 2, 3, 4, 5 ou mais domínios A variantes. Num aspeto adicional, a variante da SpA compreende pelo menos ou não mais de 1, 2, 3, 4, 5 ou mais domínios B variantes. Ainda num aspeto adicional, a variante da SpA compreende pelo menos ou não mais de 1, 2, 3, 4, 5 ou mais domínios C variantes. Ainda noutro aspeto adicional, a variante da SpA compreende pelo menos ou não mais de 1, 2, 3, 4, 5 ou mais domínios D variantes. Em determinados aspetos, a variante da SpA compreende pelo menos ou não mais de 1, 2, 3, 4, 5 ou mais domínios E variantes. Num aspeto adicional, a variante da SpA compreende uma combinação dos domínios A, B, C, D e E em várias combinações e permutações. As combinações podem incluir a totalidade ou parte de um segmento do péptido sinal da SpA, de um segmento da região X da SpA e/ou de um segmento do sinal de endereçamento da SpA. Noutros aspetos, a variante da SpA não inclui um segmento do péptido sinal da SpA, um segmento da região X da SpA e/ou um segmento do sinal de endereçamento da SpA. Em determinados aspetos, um domínio A variante compreende uma substituição na(s) posição(ões) 7, 8, 34 e/ou 35 da SEQ ID NO:4. Noutro aspeto, um domínio B variante compreende uma substituição na(s) posição(ões) 7, 8, 34 e/ou 35 da SEQ ID NO:6. Ainda noutro aspeto, um domínio C variante compreende uma substituição na(s) posição(ões) 7, 8, 34 e/ou 35 da SEQ ID NO:5. Em certos aspetos, um domínio D variante compreende uma substituição na(s) posição(ões) 9, 10, 37 e/ou 38 da SEQ ID NO:2. Num aspeto adicional, um domínio E variante compreende uma substituição na(s) posição(ões) 6, 7, 33 e/ou 34 da SEQ ID NO:3.

Ainda em aspetos adicionais, a sequência de aminoácidos de uma variante da SpA compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou 100% idêntica, incluindo todos os valores e intervalos intermédios, à sequência de aminoácidos das SEQ ID NOS: 2-6.

Em determinados aspetos, os resíduos de aminoácidos F5, S11, F13, Y14, L17, N28, I31 e/ou K35 (SEQ ID NO:2, QQNNFNKDQQSAFYEILNMPNLNEAQRNGFIQSLKDDPSQSTNVLGEAKKLNES) do subdomínio de ligação à região Fc de IgG do domínio D são

modificados ou substituídos. Em determinados aspetos, os resíduos de aminoácidos Q26, G29, F30, S33, Q40, N43 e/ou E47 (SEQ ID NO:2) do subdomínio de ligação a V_H3 do domínio D são modificados ou substituídos, de modo que a ligação a Fc ou a V_H3 é atenuada. Em aspetos adicionais, é possível efetuar modificações ou substituições correspondentes em posições correspondentes do domínio A, B, C e/ou E. As posições correspondentes são definidas através do alinhamento da sequência de aminoácidos do domínio D com uma ou mais das sequências de aminoácidos de outros domínios de ligação a IgG da SpA; ver por exemplo a FIG. 1. Em certos aspetos, a substituição de aminoácidos pode consistir em qualquer um dos outros 20 aminoácidos. Num aspeto adicional, as substituições de aminoácidos conservativas podem ser especificamente excluídas das substituições de aminoácidos possíveis. Noutros aspetos, apenas estão incluídas as substituições não conservativas. Em qualquer caso, qualquer substituição ou combinação de substituições que reduza a ligação do domínio, de forma a reduzir significativamente a toxicidade da SpA, está contemplada pela divulgação. A importância da redução ao nível da ligação aplica-se a uma variante que produz uma toxicidade mínima a inexistente quando é introduzida num sujeito e pode ser avaliada utilizando os métodos *in vitro* aqui descritos.

Em determinadas concretizações, uma SpA variante compreende pelo menos ou não mais de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais péptidos variantes do domínio D da SpA. Em certos aspetos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou mais resíduos de aminoácidos da SpA variante são substituídos ou modificados - incluindo, embora não limitados aos, aminoácidos F5, Q9, Q10, S11, F13, Y14, L17, N28, I31 e/ou K35 (SEQ ID NO:2) do subdomínio de ligação à região Fc de IgG do domínio D e os resíduos de aminoácidos Q26, G29, F30, S33, D36, D37, Q40, N43 e/ou E47 (SEQ ID NO:2) do subdomínio de ligação a V_H3 do domínio D. As variantes/mutantes da SpA ou do SpA-D não toxigénicas e purificadas aqui descritas já não são capazes de se ligarem de forma significativa (isto é, demonstram uma afinidade de ligação atenuada ou afetada) a Fc γ ou a V_H3 de F(ab)₂ e também não estimulam a apoptose das células B. Estas variantes da proteína A não toxigénicas podem ser usadas como vacinas

subunitárias, produzir respostas imunes humorais e conferir imunidade protetora contra a provocação por *S. aureus*. Em comparação com a proteína A completa de tipo selvagem ou o domínio SpA-D de tipo selvagem, a imunização com variantes do SpA-D resultou num aumento do anticorpo específico para a proteína A. Utilizando um modelo de ratinho de provocação estafilocócica e formação de abscessos, observou-se que a imunização com as variantes da proteína A não toxigénicas gerou uma proteção significativa contra a infeção estafilocócica e a formação de abscessos. Como virtualmente todas as estirpes de *S. aureus* expressam a proteína A, a imunização dos seres humanos com as variantes da proteína A não toxigénicas pode neutralizar este fator de virulência e estabelecer, assim, uma imunidade protetora. Em determinados aspetos, a imunidade protetora protege contra ou melhora a infeção por estirpes de estafilococos resistentes a drogas, tais como USA300 e outras estirpes de MRSA.

As concretizações incluem a utilização de variantes da proteína A em métodos e composições para o tratamento de uma infeção bacteriana e/ou estafilocócica. Este pedido também disponibiliza uma composição imunogénica compreendendo uma variante da proteína A ou um seu fragmento imunogénico. Em determinados aspetos, o fragmento imunogénico é um segmento do domínio D da proteína A. Além disso, o presente invento disponibiliza métodos e composições que podem ser usados para tratar (por exemplo, limitando a formação e/ou a persistência de abscessos estafilocócicos num sujeito) ou prevenir uma infeção bacteriana. Em alguns casos, os métodos para estimular uma resposta imune envolvem a administração ao sujeito de uma quantidade eficaz de uma composição que inclui ou codifica a totalidade ou parte de um polipéptido variante da proteína A ou de um antigénio e, em determinados aspetos, de outras proteínas bacterianas. Outras proteínas bacterianas incluem, embora não estejam limitadas a estas, (i) um fator de virulência segregado e/ou um péptido ou proteína de superfície celular ou (ii) uma molécula de ácido nucleico recombinante que codifica um fator de virulência segregado e/ou um péptido ou proteína de superfície celular.

Em outros aspetos, o sujeito pode receber a totalidade ou parte de uma variante da proteína A, como seja um segmento

variante do domínio D da proteína A. O polipéptido do invento pode ser formulado numa composição farmacologicamente aceitável. A composição pode ainda compreender um ou mais de pelo menos ou não mais de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 ou 19 antigénios de estafilococos adicionais ou seus fragmentos imunogénicos (por exemplo, Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla (por exemplo, mutantes H35), IsdC, SasF, vWbp ou vWh). Os antigénios de estafilococos adicionais que podem ser usados em combinação com uma variante da proteína A incluem, mas não estão limitados à, proteína de ligação à vitronectina de 52 kDa (WO 01/60852), Aaa (GenBank CAC80837), Aap (acesso no GenBank AJ249487), Ant (acesso no GenBank NP_372518), autolisina glucosaminidase, autolisina amidase, Cna, proteína de ligação ao colagénio (US6288214), EFB (FIB), proteína de ligação à elastina (EbpS), EPB, FbpA, proteína de ligação ao fibrinogénio (US6008341), proteína de ligação à fibronectina (US5840846), FnbA, FnbB, GehD (US 2002/0169288), HarA, HBP, transportador ABC imunodominante, IsaA/PisA, recetor da laminina, lipase GehD, MAP, transportador de Mg²⁺, análogo do MHC II (US5648240), MRPII, Npase, proteína de ativação de ARN III (RAP), SasA, SasB, SasC, SasD, SasK, SBI, SdrF (WO 00/12689), SdrG/Fig (WO 00/12689), SdrH (WO 00/12689), exotoxinas SEA (WO 00/02523), exotoxinas SEB (WO 00/02523), transportador ABC SitC e Ni, proteína de ligação da saliva/SitC/MntC (US5,801,234), SsaA, SSP-1, SSP-2 e/ou proteína de ligação à vitronectina (ver as publicações PCT WO2007/113222, WO2007/113223, WO2006/032472, WO2006/032475, WO2006/032500). O antigénio de estafilococos ou o seu fragmento imunogénico pode ser administrado em simultâneo com a variante da proteína A. O antigénio de estafilococos ou o seu fragmento imunogénico e a variante da proteína A podem ser administrados na mesma composição. A variante da proteína A também pode ser uma molécula de ácido nucleico recombinante que codifica uma variante da proteína A. Uma molécula de ácido nucleico recombinante pode codificar a variante da proteína A e pelo menos um antigénio de estafilococos ou um seu fragmento imunogénico. Tal como aqui utilizado, o termo "modular" ou "modulação" engloba os significados das palavras "reforçar" ou "inibir". A "modulação" da atividade poderá ser um aumento ou uma diminuição da atividade. Tal como aqui utilizado, o termo "modulador" refere-se a compostos que desempenham a função de

um grupo específico, incluindo a regulação positiva, a indução, a estimulação, a potenciação, a inibição, a regulação negativa ou a supressão de uma proteína, ácido nucleico, gene, organismo ou similar.

Em determinadas concretizações, os métodos e composições utilizam ou incluem ou codificam a totalidade ou parte da variante da proteína A ou do antigénio. Noutros aspetos, a variante da proteína A poderá ser utilizada em combinação com fatores segregados ou antigénios de superfície que incluem, embora não estejam limitados a, um ou mais de um polipéptido Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp ou vWh isolado ou um seu segmento imunogénico. Os antigénios de estafilococos adicionais que podem ser utilizados em combinação com uma variante da proteína A estão descritos acima.

Ainda em aspetos adicionais, a variante da proteína A isolada é multimérica, por exemplo, dimérica, ou é uma fusão linear de dois ou mais polipéptidos ou segmentos peptídicos. Em determinados aspetos do invento, uma composição compreende múltimeros ou concatâmeros de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais proteínas de superfície celular isoladas ou seus segmentos. Os concatâmeros são polipéptidos lineares que possuem uma ou mais unidades peptídicas de repetição. Os polipéptidos ou fragmentos da SpA podem ser consecutivos ou separados por um espaçador ou outras sequências peptídicas, por exemplo, um ou mais péptidos bacterianos adicionais. Num aspeto adicional, os outros polipéptidos ou péptidos contidos no múltímero ou no concatâmero podem incluir, mas não estão limitados a, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 de Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp, vWh ou seus fragmentos imunogénicos. Os antigénios de estafilococos adicionais que podem ser utilizados em combinação com uma variante da proteína A estão descritos acima.

O termo "variante da proteína A" ou "variante da SpA" refere-se a polipéptidos que incluem um domínio de ligação a IgG da SpA possuindo duas ou mais substituições de aminoácidos que perturbam a ligação a Fc e a V_H3. Num determinado aspeto,

a variante da SpA inclui um péptido variante do domínio D, assim como variantes de polipéptidos da SpA e seus segmentos que são não toxigénicas e estimulam uma resposta imune contra a proteína A de bactérias do tipo estafilococos e/ou contra bactérias que expressam esta proteína.

As concretizações do presente invento incluem métodos para desencadear uma resposta imune contra uma bactéria do tipo estafilococos ou contra estafilococos num sujeito, compreendendo a administração ao sujeito de uma quantidade eficaz de uma variante da proteína A ou de um seu segmento. Em determinados aspetos, os métodos para desencadear uma resposta imune contra uma bactéria do tipo estafilococos ou contra estafilococos num sujeito compreendem a administração ao sujeito de uma quantidade eficaz de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou mais proteínas segregadas e/ou proteínas de superfície celular ou seus segmentos/fragmentos. Uma proteína segregada ou uma proteína de superfície celular inclui, embora não exclusivamente, as proteínas Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp e/ou vWh e os seus fragmentos imunogénicos. Os antigénios de estafilococos adicionais que podem ser utilizados em combinação com uma variante da proteína A estão descritos acima.

As concretizações do invento incluem composições que contêm a variante da SpA que é pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica ou similar à proteína A, ou uma segunda proteína ou péptido que é uma proteína bacteriana segregada ou uma proteína de superfície celular bacteriana. Numa concretização adicional do invento, uma composição poderá incluir a variante da SpA que é pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica ou similar a um polipéptido do domínio D (SEQ ID NO:2), do domínio E (SEQ ID NO:3), do domínio A (SEQ ID NO:4), do domínio C (SEQ ID NO:5) ou do domínio B (SEQ ID NO:6) da proteína A, ou uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um polipéptido do domínio D, do domínio E, do domínio A, do domínio C ou do domínio B da proteína A. Em determinados aspetos, a variante da SpA possui uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:8. A similaridade ou identidade, em que a identidade é preferida,

é conhecida na técnica e é possível utilizar vários programas diferentes para identificar se uma proteína (ou ácido nucleico) apresenta identidade ou similaridade de sequência com uma sequência conhecida. A identidade e/ou similaridade de sequência é determinada utilizando técnicas padrão conhecidas na especialidade, incluindo, embora não exclusivamente, o algoritmo de homologia local de Smith & Waterman (1981), o algoritmo para alinhamento global de Needleman & Wunsch (1970), a pesquisa pelo método de similaridade de Pearson & Lipman (1988), implementações computadorizadas destes algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA e TFASTA no pacote de software Wisconsin Genetics, Grupo de Genética Computacional, 575 Science Drive, Madison, Wis.), o programa de sequenciação Best Fit descrito por Devereux *et al.* (1984), de preferência utilizando as configurações predefinidas, ou por inspeção. Preferencialmente, a percentagem de identidade é calculada utilizando ferramentas de alinhamento conhecidas e facilmente averiguáveis pelos peritos na especialidade. A percentagem de identidade é basicamente o número de aminoácidos idênticos dividido pelo número total de aminoácidos comparados vezes cem.

Ainda outras concretizações adicionais incluem vacinas compreendendo um polipéptido ou composição do invento e um excipiente farmacologicamente aceitável. Em determinados aspetos do invento, o polipéptido variante da SpA isolado, ou qualquer outra combinação ou permutação de proteína(s) ou péptido(s) descrita, encontra-se multimerizado, por exemplo, dimerizado ou concatamerizado. Num aspeto adicional, a composição de vacina está contaminada por menos de cerca de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5; 0,25; 0,05% (ou qualquer intervalo daí derivável) de outras proteínas de estafilococos. Uma composição poderá compreender adicionalmente um polipéptido isolado não proveniente da SpA. Tipicamente, a vacina compreende um adjuvante. Em certos aspetos, uma proteína ou péptido do invento está unido (de forma covalente ou não covalente) ao adjuvante e, de preferência, o adjuvante está conjugado quimicamente com a proteína.

Outras concretizações ainda incluem composições para utilizar em métodos destinados a estimular num sujeito uma resposta imune protetora ou terapêutica contra uma bactéria do

tipo estafilococos, compreendendo a administração ao sujeito de uma quantidade eficaz da composição do polipéptido variante da SpA ou de um seu segmento/fragmento e compreendendo ainda uma ou mais das proteínas Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp ou vWh ou respetivos péptidos. Numa concretização preferida, a composição compreende uma bactéria que não é do tipo estafilococos. Num aspeto adicional, a composição é formulada numa formulação farmacologicamente aceitável. Os estafilococos relativamente aos quais um sujeito está a receber tratamento poderão ser o *Staphylococcus aureus*. Os métodos do invento também incluem composições de variantes da SpA que contêm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou mais fatores de virulência segregados e/ou proteínas de superfície celular, tais como Eap, Ebh, Emp, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp ou vWh em várias combinações. Em determinados aspetos, uma formulação de vacina inclui Eap, Ebh, Emp, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp e vWh. Em certos aspetos, uma combinação de antigénios pode incluir (1) uma variante da SpA e IsdA; (2) uma variante da SpA e ClfB; (3) uma variante da SpA e SdrD; (4) uma variante da SpA e Hla ou uma variante de Hla; (5) uma variante da SpA e ClfB, SdrD e Hla ou uma variante de Hla; (6) uma variante da SpA, IsdA, SdrD e Hla ou uma variante de Hla; (7) uma variante da SpA, IsdA, ClfB e Hla ou uma variante de Hla; (8) uma variante da SpA, IsdA, ClfB e SdrD; (9) uma variante da SpA, IsdA, ClfB, SdrD e Hla ou uma variante de Hla; (10) uma variante da SpA, IsdA, ClfB e SdrD; (11) uma variante da SpA, IsdA, SdrD e Hla ou uma variante de Hla; (12) uma variante da SpA, IsdA e Hla ou uma variante de Hla; (13) uma variante da SpA, IsdA, ClfB e Hla ou uma variante de Hla; (14) uma variante da SpA, ClfB e SdrD; (15) uma variante da SpA, ClfB e Hla ou uma variante de Hla; ou (16) uma variante da SpA, SdrD e Hla ou uma variante de Hla.

Em determinados aspetos, uma bactéria que entrega uma composição do invento estará limitada ou atenuada em relação ao crescimento prolongado ou persistente ou à formação de abscessos. Ainda num aspeto adicional, a(s) variante(s) da SpA pode(m) ser sobreexpressa(s) numa bactéria atenuada para

reforçar ou suplementar adicionalmente uma resposta imune ou uma formulação de vacina.

Determinadas concretizações referem-se a composições para utilizar no desencadeamento de uma resposta imune contra uma bactéria do tipo estafilococos num sujeito, compreendendo a administração ao sujeito de uma quantidade eficaz de um polipéptido ou composição do invento.

Em determinados aspetos, o sujeito é diagnosticado com uma infeção estafilocócica persistente.

O termo "proteína EsxA" refere-se a uma proteína que inclui os polipéptidos EsxA de tipo selvagem isolados de bactérias do tipo estafilococos e respetivos segmentos, bem como as variantes que estimulam uma resposta imune contra as proteínas EsxA de bactérias do tipo estafilococos. De forma idêntica, os termos "proteína EsxB", "proteína SdrD", "proteína SdrE", "proteína IsdA", "proteína IsdB", "proteína Eap", "proteína Ebh", "proteína Emp", "proteína EsaB", "proteína EsaC", "proteína SdrC", "proteína ClfA", "proteína ClfB", "proteína Coa", "proteína Hla", "proteína IsdC" e "proteína SasF" referem-se a proteínas que incluem os polipéptidos EsxA, EsxB, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, SdrC, ClfA, ClfB, CoA, Hla, IsdC ou SasF de tipo selvagem isolados de bactérias do tipo estafilococos e respetivos segmentos, bem como as variantes que estimulam uma resposta imune contra as proteínas EsxA, EsxB, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, SdrC, ClfA, ClfB, CoA, Hla, IsdC ou SasF de bactérias do tipo estafilococos.

O termo "proteína vWbp" refere-se a uma proteína que inclui os polipéptidos vWbp (proteína de ligação ao fator de von Willebrand) de tipo selvagem isolados de bactérias do tipo estafilococos e respetivos segmentos, bem como as variantes que estimulam uma resposta imune contra as proteínas vWbp de bactérias do tipo estafilococos.

O termo "proteína vWh" refere-se a uma proteína que inclui os polipéptidos vWh (homólogo da proteína de ligação ao fator de von Willebrand) de tipo selvagem isolados de bactérias do tipo estafilococos e respetivos segmentos, bem como as

variantes que estimulam uma resposta imune contra as proteínas vWh de bactérias do tipo estafilococos.

Uma resposta imune refere-se a uma resposta humoral, uma resposta celular ou uma resposta tanto humoral como celular num organismo. Uma resposta imune pode ser medida por meio de ensaios que incluem, mas não estão limitados a, ensaios que medem a presença ou a quantidade de anticorpos que reconhecem especificamente uma proteína ou uma proteína de superfície celular, ensaios que medem a ativação ou proliferação das células T e/ou ensaios que medem a modulação em termos da atividade ou da expressão de uma ou mais citocinas.

Ainda em concretizações adicionais do invento, uma composição poderá incluir um polipéptido, péptido ou proteína que é ou é pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntico ou similar a uma proteína EsxA, EsxB, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, EsaB, ClfB, IsdC, SasF, SdrC, ClfA, Eap, Ebh, Emp, EsaC, CoA, Hla, vWa ou vWbp. Em determinados aspetos, a proteína EsxA possuirá a totalidade ou parte da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:11.

Em determinados aspetos, a proteína EsxB possuirá a totalidade ou parte da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:12.

Em determinados aspetos, a proteína SdrD possuirá a totalidade ou parte da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:13.

Em determinados aspetos, a proteína SdrE possuirá a totalidade ou parte da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:14.

Em determinados aspetos, a proteína IsdA possuirá a totalidade ou parte da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:15.

Em determinados aspetos, a proteína IsdB possuirá a totalidade ou parte da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:16.

Em determinados aspetos, a proteína EsaB possuirá a totalidade ou parte da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:17.

Em determinados aspetos, a proteína ClfB possuirá a totalidade ou parte da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:18.

Em determinados aspetos, a proteína IsdC possuirá a totalidade ou parte da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:19.

Em determinados aspetos, a proteína SasF possuirá a totalidade ou parte da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:20.

Em determinados aspetos, a proteína SdrC possuirá a totalidade ou parte da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:21.

Em determinados aspetos, a proteína ClfA possuirá a totalidade ou parte da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:22.

Em determinados aspetos, a proteína Eap possuirá a totalidade ou parte da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:23.

Em determinados aspetos, a proteína Ebh possuirá a totalidade ou parte da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:24.

Em determinados aspetos, a proteína Emp possuirá a totalidade ou parte da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:25.

Em determinados aspetos, a proteína EsaC possuirá a totalidade ou parte da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:26. A sequência dos polipéptidos EsaC pode ser encontrada nas bases de dados de proteínas e inclui, mas não está limitada aos, números de acesso ZP_02760162 (GI:168727885), NP_645081.1 (GI:21281993) e NP_370813.1 (GI:15923279).

Em determinados aspetos, a proteína Coa possuirá a totalidade ou parte da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:27.

Em determinados aspetos, a proteína Hla possuirá a totalidade ou parte da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:28.

Em determinados aspetos, a proteína vWa possuirá a totalidade ou parte da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:29.

Em determinados aspetos, a proteína vWbp possuirá a totalidade ou parte da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:32.

Em determinados aspetos, um polipéptido ou segmento/fragmento pode ter uma sequência que é pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% ou mais idêntica à sequência de aminoácidos do polipéptido de referência. O termo "similaridade" refere-se a um polipéptido que possui uma sequência com uma determinada percentagem de aminoácidos que são idênticos ao polipéptido de referência ou constituem substituições conservativas em relação aos polipéptidos de referência.

Os polipéptidos aqui divulgados poderão incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ou mais aminoácidos variantes em pelo menos, ou não mais de, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171,

172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 300, 400, 500, 550, 1000 ou mais aminoácidos contíguos, ou qualquer intervalo daí derivável, das SEQ ID NO:2-30 ou das SEQ ID NO:32-34.

Um segmento polipeptídico conforme aqui divulgado poderá incluir 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 300, 400, 500, 550, 1000 ou mais aminoácidos contíguos, ou qualquer intervalo daí derivável, das SEQ ID NO:2-30 ou das SEQ ID NO:33-34.

As composições poderão ser formuladas numa composição farmacêuticamente aceitável. Em determinados aspetos do invento, a bactéria do tipo estafilococos é uma bactéria *S. aureus*.

Em aspetos adicionais, uma composição poderá ser administrada mais de uma vez ao sujeito e poderá ser administrada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 ou mais

vezes. A administração das composições inclui, embora não esteja limitada a estes exemplos, a administração oral, parentérica, subcutânea, intramuscular, intravenosa ou várias combinações delas, incluindo por inalação ou aspiração.

Noutras concretizações ainda, uma composição compreende uma molécula de ácido nucleico recombinante que codifica um polipéptido variante da SpA aqui descrito ou segmentos/fragmentos dele. Tipicamente, uma molécula de ácido nucleico recombinante que codifica um polipéptido aqui descrito contém um promotor heterólogo. Em determinados aspetos, uma molécula de ácido nucleico recombinante do invento é um vetor; noutros aspetos ainda, o vetor é um plasmídeo. Em certas concretizações, o vetor é um vetor viral. Em certos aspetos, uma composição inclui uma bactéria recombinante que não é do tipo estafilococos contendo ou expressando um polipéptido aqui descrito. Em aspetos particulares, a bactéria recombinante que não é do tipo estafilococos é *Salmonella* ou outra bactéria gram-positiva. Uma composição é tipicamente administrada a mamíferos, por exemplo sujeitos humanos, embora a administração a outros animais capazes de desencadear uma resposta imune esteja contemplada. Em aspetos adicionais, a bactéria do tipo estafilococos contendo ou expressando o polipéptido é *Staphylococcus aureus*. Em concretizações adicionais, a resposta imune é uma resposta imune protetora.

Em concretizações adicionais, uma composição compreende uma molécula de ácido nucleico recombinante que codifica a totalidade ou parte de uma ou mais de uma das proteínas Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, SpA, vWbp ou vWh ou de um seu péptido ou variante. Os antigénios de estafilococos adicionais que podem ser usados em combinação com os polipéptidos aqui divulgados estão descritos acima. Em aspetos particulares, uma bactéria é uma bactéria recombinante que não é do tipo estafilococos, tal como *Salmonella* ou outras bactérias gram-positivas.

As composições do invento são tipicamente administradas a sujeitos humanos, embora a administração a outros animais capazes de desencadear uma resposta imune a uma bactéria do tipo estafilococos esteja contemplada, particularmente gado,

cavalos, cabras, ovelhas e outros animais domésticos, isto é mamíferos.

Em determinados aspetos, a bactéria do tipo estafilococos é um *Staphylococcus aureus*. Em concretizações adicionais, a resposta imune é uma resposta imune protetora. Ainda em aspetos adicionais, os métodos e composições do invento destinam-se a ser utilizados na prevenção, melhoramento, redução ou tratamento de uma infeção dos tecidos ou das glândulas, por exemplo, das glândulas mamárias, particularmente da mastite e outras infeções. Outros métodos incluem, embora não estejam limitados a ela, a redução profilática da carga bacteriana num sujeito que não apresenta sinais de infeção, particularmente naqueles sujeitos suspeitos ou em risco de serem colonizados por uma bactéria-alvo, por exemplo, os doentes que estão ou estarão em risco ou são suscetíveis de infeção durante uma estadia, tratamento e/ou recuperação hospitalar.

Qualquer concretização discutida em relação a um aspeto do invento aplica-se igualmente a outros aspetos do invento. Em particular, qualquer concretização discutida no contexto de um polipéptido ou péptido ou ácido nucleico variante da SpA poderá ser implementada relativamente a outros antigénios, tais como Eap, Ebh, Emp, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp, vWh, proteína de ligação à vitronectina de 52 kDa (WO 01/60852), Aaa, Aap, Ant, autolisina glucosaminidase, autolisina amidase, Cna, proteína de ligação ao colagénio (US6288214), EFB (FIB), proteína de ligação à elastina (EbpS), EPB, FbpA, proteína de ligação ao fibrinogénio (US6008341), proteína de ligação à fibronectina (US5840846), FnbA, FnbB, GehD (US 2002/0169288), HarA, HBP, transportador ABC imunodominante, IsaA/PisA, recetor da laminina, lipase GehD, MAP, transportador de Mg²⁺, análogo do MHC II (US5648240), MRPII, Npase, proteína de ativação de ARN III (RAP), SasA, SasB, SasC, SasD, SasK, SBI, SdrF (WO 00/12689), SdrG/Fig (WO 00/12689), SdrH (WO 00/12689), exotoxinas SEA (WO 00/02523), exotoxinas SEB (WO 00/02523), transportador ABC SitC e Ni, proteína de ligação da saliva/SitC/MntC (US5,801,234), SsaA, SSP-1, SSP-2 e/ou proteína de ligação à vitronectina (ou ácidos nucleicos) e vice-versa. Entende-se igualmente que qualquer um ou mais de um de Eap, Ebh, Emp, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA,

IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp, vWh, proteína de ligação à vitronectina de 52 kDa (WO 01/60852), Aaa, Aap, Ant, autolisina glucosaminidase, autolisina amidase, Cna, proteína de ligação ao colagénio (US6288214), EFB (FIB), proteína de ligação à elastina (EbpS), EPB, FbpA, proteína de ligação ao fibrinogénio (US6008341), proteína de ligação à fibronectina (US5840846), FnbA, FnbB, GehD (US 2002/0169288), HarA, HBP, transportador ABC imunodominante, IsaA/PisA, recetor da laminina, lipase GehD, MAP, transportador de Mg²⁺, análogo do MHC II (US5648240), MRPII, Npase, proteína de ativação de ARN III (RAP), SasA, SasB, SasC, SasD, SasK, SBI, SdrF (WO 00/12689), SdrG/Fig (WO 00/12689), SdrH (WO 00/12689), exotoxinas SEA (WO 00/02523), exotoxinas SEB (WO 00/02523), transportador ABC SitC e Ni, proteína de ligação da saliva/SitC/MntC (US5,801,234), SsaA, SSP-1, SSP-2 e/ou proteína de ligação à vitronectina podem ser especificamente excluídos de uma composição reivindicada.

As concretizações do invento incluem composições que contêm ou que não contêm uma bactéria. Uma composição poderá ou não incluir uma bactéria estafilocócica atenuada ou viável ou intacta. Em determinados aspetos, a composição compreende uma bactéria que não é uma bactéria estafilocócica ou não contém uma bactéria estafilocócica. Em determinadas concretizações da divulgação, uma composição bacteriana compreende uma variante da proteína A de estafilococos isolada ou expressa de modo recombinante, ou um nucleótido que codifica a mesma. A composição poderá consistir em ou incluir uma bactéria do tipo estafilococos manipulada recombinantemente, que foi alterada de uma forma que compreende especificamente alterar a bactéria em relação a um fator de virulência segregado ou a uma proteína de superfície celular. Por exemplo, a bactéria poderá ser modificada recombinantemente para expressar mais fator de virulência ou mais proteína de superfície celular do que expressaria caso não fosse modificada.

O termo "isolado" pode referir-se a um ácido nucleico ou um polipéptido que está praticamente isento de material celular, material bacteriano, material viral, meio de cultura (quando é produzido por técnicas de ADN recombinante) da sua fonte de proveniência ou precursores químicos ou outros

reagentes químicos (quando é sintetizado quimicamente). Além disso, um composto isolado refere-se a um composto que pode ser administrado a um sujeito como um composto isolado; por outras palavras, o composto poderá simplesmente não ser considerado "isolado" se estiver aderido a uma coluna ou embutido num gel de agarose. Adicionalmente, um "fragmento de ácido nucleico isolado" ou um "péptido isolado" é um fragmento de ácido nucleico ou de proteína que não existe naturalmente como um fragmento e/ou que não está tipicamente no estado funcional.

Os grupos específicos do invento, como polipéptidos, péptidos, antigénios ou imunogénios, poderão ser conjugados ou ligados covalente ou não covalentemente a outros grupos específicos, tais como adjuvantes, proteínas, péptidos, suportes, grupos fluorescentes ou marcadores. O termo "conjugado" ou "imunconjugado" é utilizado de uma forma ampla para definir a associação funcional de um grupo específico com outro agente e não pretende referir-se apenas a qualquer tipo de associação funcional, em particular, não está limitado à "conjugação" química. As proteínas de fusão recombinantes, em particular, estão contempladas. As composições do invento poderão ainda compreender um adjuvante ou um excipiente farmacologicamente aceitável. Um adjuvante poderá ser acoplado covalente ou não covalentemente a um polipéptido ou péptido do invento. Em determinados aspetos, o adjuvante é conjugado quimicamente com uma proteína, polipéptido ou péptido.

O termo "disponibilizar" é utilizado de acordo com o seu significado habitual para indicar "fornecer ou prover para utilização". Em algumas concretizações, a proteína é diretamente disponibilizada mediante administração da proteína, ao passo que noutras concretizações a proteína é efetivamente disponibilizada mediante administração de um ácido nucleico que codifica a proteína. Em certos aspetos, o invento contempla composições que compreendem várias combinações de ácidos nucleicos, antigénios, péptidos e/ou epitopos.

O sujeito terá (por exemplo, é diagnosticado com uma infeção estafilocócica), será suspeito de ter ou estará em risco de desenvolver uma infeção estafilocócica. As

composições do presente invento incluem composições imunogénicas em que o(s) antigénio(s) ou epitopo(s) estão incluídos numa quantidade eficaz para atingir o objetivo pretendido. Mais especificamente, uma quantidade eficaz significa uma quantidade de ingredientes ativos necessária para estimular ou desencadear uma resposta imune, ou proporcionar resistência, uma melhoria ou uma mitigação da infeção. Em aspetos mais específicos, uma quantidade eficaz previne, alivia ou melhora os sintomas da doença ou infeção, ou prolonga a sobrevivência do sujeito em tratamento. A determinação da quantidade eficaz encontra-se perfeitamente dentro das capacidades dos peritos na especialidade, especialmente à luz da divulgação detalhada aqui disponibilizada. Para qualquer preparação usada nos métodos do invento, uma quantidade ou dose eficaz pode ser inicialmente estimada a partir de estudos *in vitro*, ensaios em cultura celular e/ou ensaios em modelos animais. Por exemplo, uma dose pode ser formulada em modelos animais para obter uma resposta imune desejada ou uma concentração ou título de anticorpo circulante desejado. Tais informações podem ser usadas para determinar com maior precisão as doses úteis em seres humanos.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

De modo que as características, vantagens e objetos do invento acima referidos, bem como outros que serão evidentes, sejam alcançados e possam ser compreendidos em pormenor, descrições mais particulares e determinadas concretizações do invento resumidas brevemente acima estão ilustradas nas figuras anexas. Estas figuras fazem parte do fascículo. Deve salientar-se, contudo, que as figuras anexas ilustram determinadas concretizações do invento e, por conseguinte, o seu âmbito não deve ser considerado limitativo.

FIG. 1A - 1E Geração de uma vacina de proteína A não toxigénica. FIG. 1A, Produto traducional proteína A (SpA) de *S. aureus* Newman e USA300 LAC com um péptido sinal N-terminal (caixa branca), cinco domínios de ligação a imunoglobulinas (IgBD designados por E, D, A, B e C), uma região variável X e um sinal de endereçamento C-terminal (caixa preta). FIG. 1B, Sequência de aminoácidos dos cinco IgBD, bem como do SpA-D_{KKAA} não toxigénico, onde estão indicadas as posições dos feixes de

três hélices α (H1, H2 e H3), assim como das glutaminas (Q) 9, 10 e aspartatos (D) 36, 37. FIG. 1C, SDS-PAGE corado com azul de Coomassie de SpA, SpA-D, SpA-D_{KKAA} ou SrtA purificadas em Ni-NTA Sepharose, na presença ou na ausência de imunoglobulina humana (hIgG). FIG. 1D, ELISA examinando a associação das proteínas SpA, SpA-D ou SpA-D_{KKAA} imobilizadas à IgG humana, assim como aos seus fragmentos Fc ou F(ab)₂ e ao fator de von Willebrand (vWF). FIG. 1E, Os linfócitos B CD19+ no tecido esplênico de ratinhos BALB/c, que haviam sido imunizados de forma simulada ou tratados com SpA-D ou SpA-D_{KKAA}, foram quantificados por FACS.

FIG. 2 A vacina de proteína A não toxigénica previne a formação de abscessos. Histopatologia de tecido renal isolado durante a necropsia de ratinhos BALB/c, que haviam sido imunizados de forma simulada (PBS) ou vacinados com SpA, SpA-D bem como SpA-D_{KKAA} e provocados com *S. aureus* Newman. Os tecidos finamente seccionados foram corados com hematoxilina-eosina. As setas brancas identificam os infiltrados de leucócitos polimorfonucleares (PMN). As setas pretas indicam as comunidades do abscesso estafilocócico.

FIG. 3A-C Os anticorpos originados pela vacina de proteína A não toxigénica bloqueiam a função de superantigénio das células B da SpA. FIG 3A, Os anticorpos de coelho produzidos contra SpA-D_{KKAA} foram purificados numa matriz com o antigénio imobilizado e analisados por SDS-PAGE corado com azul de Coomassie. Os anticorpos foram clivados com pepsina e os fragmentos F(ab)₂ foram purificados por um segundo ciclo de cromatografia de afinidade numa matriz com SpA-D_{KKAA}. FIG 3B, O fragmento F(ab)₂ específico para SpA-D_{KKAA} interfere com a ligação de SpA ou SpA-D à imunoglobulina humana (hIgG) ou, FIG 3C, ao fator de von Willebrand (vWF).

FIG. 4A-D A proteína A não toxigénica completa dá origem a respostas imunes melhoradas. FIG 4A, A proteína SpA_{KKAA} completa foi purificada em Ni-NTA Sepharose e analisada por SDS-PAGE corado com azul de Coomassie. FIG 4B, Os linfócitos B CD19+ no tecido esplênico de ratinhos BALB/c, que haviam sido imunizados de forma simulada ou tratados com SpA ou SpA_{KKAA}, foram quantificados por FACS. FIG 4C, ELISA examinando a associação das proteínas SpA ou SpA_{KKAA} imobilizadas à IgG

humana, assim como aos seus fragmentos Fc ou F(ab)₂ ou ao fator de von Willebrand (vWF). FIG 4D, Títulos de anticorpos séricos humanos ou de ratinho para o toxoide diftérico (CRM197) e as proteínas SpA_{KKAA} ou SpA-D_{KKAA} não toxigênicas. Voluntários humanos com um historial de imunização com DTaP e infecção por estafilococos (n=16), assim como ratinhos (n=20) que haviam sido infetados com *S. aureus* Newman ou USA 300 LAC ou imunizados com SpA_{KKAA} ou SpA-D_{KKAA} foram examinados por ensaio de *dot-blot* quantitativo.

FIG. 5 A proteína A é necessária para a patogênese das infecções letais por *S. aureus* em ratinhos. Coortes de ratinhos BALB/c (n=8) foram injetados com suspensões de 2×10^8 UFC de *S. aureus* Newman ou da sua variante isogênica de deleção da proteína A (Δ spa) em PBS. Os animais infetados foram monitorizados quanto à sobrevivência ao longo de um período de 15 dias.

FIG. 6A-B Os anticorpos contra a proteína A protegem os ratinhos contra as infecções letais por *S. aureus*. FIG 6A, Coortes de ratinhos BALB/c (n=10) foram injetados com 5 mg kg^{-1} de IgG de coelho purificado por afinidade específico para SpA_{KKAA} (α -SpA_{KKAA}) ou para o antigénio vacinal da peste rV10 (DeBord *et al.*, 2006) (simulação). Quatro horas mais tarde, cada animal foi infetado por injeção intraperitoneal com uma suspensão de 3×10^8 UFC de *S. aureus* Newman e monitorizado quanto à sobrevivência ao longo de um período de 10 dias. Os resultados são representativos de três experiências independentes. FIG 6B, Coortes de ratinhos BALB/c (n=10) foram imunizados via sensibilização-reforço com SpA_{KKAA} ou controlo de PBS/adjuvante (simulação). Cada animal foi subsequentemente infetado por injeção intraperitoneal com uma suspensão de 6×10^8 UFC de *S. aureus* Newman e monitorizado quanto à sobrevivência ao longo de um período de 10 dias. A significância estatística (P) foi analisada com o teste log-rank desemparelhado bicaudal. Os resultados são representativos de três experiências independentes.

FIG. 7 A imunização com SpA_{KKAA} protege os ratinhos contra a provocação com o isolado de MRSA resistente à vancomicina Mu50. Coortes de ratinhos BALB/c (n=15) foram imunizados via sensibilização-reforço com SpA_{KKAA} ou controlo de PBS/adjuvante

(simulação). Cada animal foi subsequentemente infetado por injeção intraperitoneal com uma suspensão de 3×10^7 UFC de *S. aureus* Mu50. A carga estafilocócica, calculada como \log_{10} UFC g^{-1} , foi determinada em tecidos renas homogeneizados 4 dias após a infeção. A significância estatística foi calculada com o teste *t* de Student desemparelhado bicaudal, e o valor P foi registado.

FIG. 8A-B Ausência de respostas imunes protetoras às infeções por estafilococos. FIG 8A, A infeção por estafilococos não gera imunidade protetora. Ratinhos BALB/c (n=10) foram infetados com *S. aureus* Newman ou provocados de forma simulada (PBS) durante trinta dias e a infeção foi eliminada mediante tratamento com cloranfenicol. Ambos os coortes de animais foram depois provocados com *S. aureus* Newman e a carga bacteriana (UFC) no homogenato de tecido renal foi analisada após necropsia no dia 4. Os resultados são representativos de três análises independentes. FIG 8B, A imunização com IsdB não protege os ratinhos contra a provocação com *S. aureus* USA300 (LAC). Ratinhos BALB/c (n=10) foram imunizados com IsdB (100 μ g de IsdB emulsionado em CFA, seguido de reforço com IFA/IsdB no dia 11) e provocados por injeção retro-orbital com 5×10^6 UFC de *S. aureus* USA300 (LAC) no dia 21. Quatro dias após a provocação, os rins foram removidos durante a necropsia e a carga estafilocócica por grama de tecido homogeneizado foi determinada via formação de colónias em placas agarizadas. Em comparação com os animais imunizados de forma simulada (PBS/adjuvante) com $6,93 (\pm 0,24) \log_{10}$ UFC g^{-1} , a vacinação com IsdB ficou associada a $6,25 (\pm 0,46) \log_{10}$ UFC g^{-1} e não gerou uma proteção estatisticamente significativa ($P=0,2138$; teste *t* de Student bicaudal) contra a provocação por USA300 (LAC). Os resultados são representativos de três análises independentes.

FIG. 9 Comparação da formação de abscessos em ratinhos tratados com PBS, SpA, SpA-D e SpA-D_{KKAA}.

FIG. 10A-10H Localização da protrombina, fibrinogénio, coagulase (Coa) e proteína de ligação ao fator de von Willebrand (vWbp) nos abscessos estafilocócicos. Ratinhos BALB/c infetados por inoculação intravenosa com 1×10^7 UFC de *S. aureus* Newman foram mortos 5 dias após a infeção. Os rins

foram removidos, incluídos em parafina, cortados em secções finas e corados por imuno-histoquímica, utilizando anticorpos de coelho (α) específicos para a protrombina de ratinho (FIG. 10A, 10C), o fibrinogénio/fibrina de ratinho (FIG. 10B, 10D), a Coa de *S. aureus* (FIG. 10E, 10G) ou a vWbp de *S. aureus* (FIG. 10F, 10H). As imagens apresentadas são representativas de três rins analisados. Os painéis das FIG. 10C, 10D, 10G e 10H ilustram a imunocoloração no interior de um único abscesso analisada como quatro secções sequenciais, ampliadas a partir de uma área nos painéis das FIG. 10A, 10B, 10E e 10F que está definida por uma caixa com margens brancas.

FIG. 11A-11C Os mutantes *coa* e *vWbp* de *Staphylococcus aureus* apresentam defeitos ao nível da coagulação sanguínea. (FIG. 11A) Diagrama ilustrando o produto de tradução primário de *coa* e *vWbp*, incluindo o péptido sinal (S), os domínios D1 e D2 de ligação à protrombina, um domínio de função desconhecida, o local de ligação ao fator de von Willebrand (vWF) em *vWbp* e as repetições de ligação ao fibrinogénio (R) de Coa. Os números indicam os resíduos de aminoácidos. (FIG. 11B) Os sobrenadantes de cultura de *S. aureus* Newman (tipo selvagem) ou das variantes isogénicas desprovidas de *coa* (Δ *coa*), *vWbp* (Δ *vWbp*) ou de ambos os genes (Δ *coa*, Δ *vWbp*) foram examinados por imunotransferência com anticorpos específicos para Coa (α Coa) ou *vWbp* (α *vWbp*). Para os estudos de complementação, plasmídeos expressando os alelos de tipo selvagem de *coa* (*pcoa*) ou *vWbp* (*pvWbp*) foram introduzidos por eletroporação nas estirpes estafilocócicas e subsequentemente analisados por imunotransferência. (FIG. 11C) O sangue de ratinho tratado com lepirudina foi tratado de forma simulada ou infetado com *S. aureus* Newman ou com as suas variantes isogénicas de coagulases e incubado até 48 horas a 25°C. Os tubos foram inclinados para avaliar a coagulação. Os resultados são representativos de quatro determinações independentes.

FIG. 12A-12R Contribuições de *coa* e *vWbp* para a sobrevivência bacteriana no sangue e para a bacteriemia letal induzida por *S. aureus* em ratinhos. (FIG. 12A) As estirpes de estafilococos Newman, Δ *coa*, Δ *vWbp* ou Δ *coa*, Δ *vWbp* e as variantes complementadas foram incubadas com sangue de ratinho anticoagulado com lepirudina durante 30 minutos, e a sobrevivência bacteriana foi avaliada por formação de colónias

em placas agarizadas. Os resultados foram produzidos por três ensaios separados. (FIG. 12B) Coortes de 10 ratinhos foram injetados no plexo retro-orbital com 1×10^8 UFC de *S. aureus* Newman (tipo selvagem), bem como de Δ coa, Δ vWbp ou Δ coa, Δ vWbp. A sobrevivência dos animais com o tempo foi registrada ao longo de 10 dias. De forma idêntica a B, os ratinhos receberam 1×10^7 UFC das estirpes estafilocócicas Newman (FIG. 12C, E e K, M), Δ vWbp (FIG. 14D, F e M, L), Δ coa (FIG. 14G, I e O, Q) ou Δ coa, Δ vWbp (FIG. 12H, J e P, R), foram colhidos nos dias 5 (FIG. 12C-J) ou 15 (FIG. 12K-R) e avaliados quanto à carga bacteriana no tecido renal (Tabela 7) e à formação de abscessos histopatológicos. Todos os resultados dos animais são representativos de duas experiências independentes.

FIG. 13A-13D Os anticorpos contra Coa e vWbp bloqueiam a coagulação do sangue pelas coagulases estafilocócicas. (FIG. 13A) His₆-Coa e His₆-vWbp foram purificadas por cromatografia de afinidade a partir de *E. coli* e analisadas por SDS-PAGE corado com azul de Coomassie. (FIG. 13B) Os anticorpos de coelho produzidos contra His₆-Coa ou His₆-vWbp foram purificados por afinidade e analisados por ELISA quanto à sua imunorreatividade com coagulases purificadas. Os resultados são a média de três determinações experimentais independentes. (FIG. 13C) O sangue de ratinho tratado com lepirudina foi tratado com PBS (simulação), anticorpos irrelevantes (α V10) ou anticorpos dirigidos contra Coa (α Coa), vWbp (α vWbp) ou ambas as coagulases (α Coa/ α vWbp), antes da infecção com *S. aureus* Newman e incubação durante 48 horas a 25 °C. (FIG. 13D) O sangue de ratinho tratado com lepirudina foi tratado com os anticorpos como acima. As amostras de sangue foram depois incubadas com Coa ou vWbp funcionalmente ativa e o tempo de coagulação foi registrado.

FIG. 14A-14F Efeitos biológicos de anticorpos dirigidos contra as coagulases estafilocócicas. Medição por ressonância de plasma de superfície da perturbação por anticorpos da associação entre Coa ou vWbp e a protrombina ou o fibrinogénio. As diferenças de resposta com a adição de coagulase (Coa) à protrombina (FIG. 14A) ou ao fibrinogénio (FIG. 14B) foram comparadas com as diferenças de resposta na presença de quantidades crescentes de anticorpos (α Coa - 1:1, 1:2, 1:4, 1:8). As diferenças de resposta com a adição de vWbp à

protrombina (FIG. 16A) ou ao fibrinogénio (FIG. 14B) foram comparadas com as diferenças de resposta na presença de quantidades crescentes de anticorpos (α Wbp - 1:1, 1:2, 1:4, 1:8). (FIG. 14E, F) A proteína Coa ou vWbp ativa purificada foi incubada, numa razão molar 1:1, com protrombina humana. A capacidade enzimática do complexo foi avaliada através de monitorização da velocidade de clivagem do S-2238 (substrato cromogénico substituto do fibrinogénio, adicionado em excesso). O ensaio foi repetido na presença de anticorpos específicos ou cruzados adicionados num excesso de 3 M, e os dados foram normalizados para a % de atividade média sem inibição. Os resultados são uma média de três ensaios independentes.

FIG. 15 Contribuição de anticorpos específicos de coagulases para a sobrevivência de ratinhos com bacteriemia estafilocócica. Vinte e quatro horas antes da infeção, ratinhos BALB/c (n=15) foram injetados no peritoneu com anticorpos de coelho purificados (5 mg anticorpo/kg peso corporal). Os animais foram depois provocados com 1×10^8 UFC de *S. aureus* Newman injetado no plexo retro-orbital e monitorizados em termos de sobrevivência. Os resultados são representativos de duas experiências independentes.

FIG. 16A-16H A transferência passiva de anticorpos dirigidos contra coagulases confere proteção contra a formação de abscessos por *S. aureus*. Injetou-se uma simulação experimental (PBS, FIG. 18A e 18C) ou anticorpos de coelho purificados dirigidos contra vWbp (α Wbp, FIG. 18B e 18D), Coa (α Coa, FIG. 18E e 18G) ou ambas as coagulases (α Coa/ α vWbp, FIG. 18F e 18H) na cavidade peritoneal de ratinhos BALB/c (n=10) e analisaram-se os títulos de anticorpos por ELISA (Tabela 8). Os animais imunizados passivamente foram infetados por injeção de 1×10^7 UFC de *S. aureus* Newman no plexo retro-orbital. A carga bacteriana e a formação de abscessos foram determinadas após necropsia dos rins de animais que haviam sido mortos cinco dias após a infeção. Os tecidos renais foram fixados com paraformaldeído, incluídos em parafina, cortados em secções finas, corados com hematoxilina-eosina e as imagens histopatológicas adquiridas por microscopia ótica. Os resultados são representativos de duas experiências separadas.

FIG. 17 A-H A imunização com coagulases protege os ratinhos contra a formação de abscessos por *S. aureus*. Ratinhos BALB/c (n=15) foram imunizados com 50 µg de His₆-Coa, His₆-vWbp, His₆-Coa e His₆-vWbp ou simulação (PBS) emulsionadas com adjuvante no dia 0 e no dia 11, e os títulos de anticorpos foram analisados por ELISA no dia 21 (Tabela 8). No dia 21, os animais foram provocados por injeção de 1×10^7 UFC de *S. aureus* Newman no plexo retro-orbital. A carga bacteriana e a formação de abscessos foram determinadas após necropsia dos rins de animais que haviam sido mortos cinco dias após a infecção. Os tecidos renais foram fixados com paraformaldeído, incluídos em parafina, cortados em secções finas, corados com hematoxilina-eosina e as imagens histopatológicas adquiridas por microscopia ótica. Os resultados são representativos de duas experiências separadas.

DESCRIÇÃO DETALHADA

O *Staphylococcus aureus* é um parasita da pele e das narinas humanas e a causa principal de infecções da corrente sanguínea, da pele e dos tecidos moles (Klevens *et al.*, 2007). Os recentes aumentos dramáticos na mortalidade de doenças estafilocócicas são atribuídos à disseminação de estirpes de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) que, com frequência, não são suscetíveis aos antibióticos (Kennedy *et al.*, 2008). Num grande estudo retrospectivo, a incidência de infecções por MRSA representou 4,6% de todas as admissões hospitalares nos Estados Unidos (Klevens *et al.*, 2007). Os custos anuais de saúde com os 94.300 indivíduos infetados com MRSA, nos Estados Unidos, ultrapassaram os 2,4 mil milhões de dólares (Klevens *et al.*, 2007). A atual epidemia de MRSA precipitou uma crise de saúde pública que precisa de ser abordada através do desenvolvimento de uma vacina preventiva (Boucher and Corey, 2008). Até à data, não se encontra disponível uma vacina aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) que previna as doenças por *S. aureus*.

Os inventores descrevem aqui a utilização da proteína A, uma proteína de superfície de estafilococos ancorada à parede celular, para a geração de variantes que podem atuar como vacinas subunitárias. A patogénese das infecções estafilocócicas tem início quando as bactérias invadem a pele

ou a corrente sanguínea via traumatismo, feridas cirúrgicas ou dispositivos médicos (Lowy, 1998). Embora o organismo patogénico invasor possa sofrer fagocitose e ser morto, os estafilococos também conseguem escapar às defesas imunes inatas e semear infeções nos tecidos dos órgãos, induzindo respostas inflamatórias que atraem macrófagos, neutrófilos e outros fagócitos (Lowy, 1998). A invasão do local de infeção por parte das células imunes como resposta é acompanhada por necrose de liquefação à medida que o hospedeiro tenta evitar a disseminação estafilocócica e permitir a remoção dos resíduos de tecido necrótico (Lam *et al.*, 1963). Tais lesões podem ser observadas por microscopia como áreas hipercelulares contendo tecido necrótico, leucócitos e um nidus central de bactérias (Lam *et al.*, 1963). A não ser que os abscessos estafilocócicos sejam drenados cirurgicamente e tratados com antibióticos, a infeção disseminada e a septicemia produzem um resultado letal (Sheagren, 1984).

III. Antígenos de estafilococos

A. Proteína A de estafilococos (SpA)

Todas as estirpes de *Staphylococcus aureus* expressam o gene estrutural para a proteína A (spa) (Jensen, 1958; Said-Salim *et al.*, 2003), um fator de virulência bem caracterizado cujo produto proteico de superfície ancorado à parede celular (SpA) engloba cinco domínios de ligação a imunoglobulinas altamente homólogos denominados E, D, A, B e C (Sjodahl, 1977). Estes domínios apresentam uma identidade de ~80% ao nível dos aminoácidos, têm 56 a 61 resíduos de comprimento e estão organizados como repetições em tandem (Uhlen *et al.*, 1984). A SpA é sintetizada como uma proteína precursora com um péptido sinal YSIRK/GS N-terminal e um sinal de endereçamento C-terminal com o motivo LPXTG (DeDent *et al.*, 2008; Schneewind *et al.*, 1992). A proteína A ancorada à parede celular é apresentada em grande abundância na superfície estafilocócica (DeDent *et al.*, 2007; Sjoquist *et al.*, 1972). Cada um dos seus domínios de ligação a imunoglobulinas é constituído por hélices α antiparalelas que se dispõem num feixe de três hélices e se ligam ao domínio Fc da imunoglobulina G (IgG) (Deisenhofer, 1981; Deisenhofer *et al.*, 1978), à cadeia pesada VH3 (Fab) da IgM (isto é, o recetor das células B) (Graille *et al.*, 2000),

ao fator de von Willebrand ao nível do seu domínio A1 [o domínio A1 de vWF é um ligando para as plaquetas] (O'Seaghda *et al.*, 2006) e ao recetor I do fator de necrose tumoral α (TNF- α) (TNFRI) (Gomez *et al.*, 2006), que é apresentado nas superfícies dos epitélios das vias respiratórias (Gomez *et al.*, 2004; Gomez *et al.*, 2007).

A SpA impede a fagocitose dos estafilococos por parte dos neutrófilos através do seu atributo de ligação ao componente Fc da IgG (Jensen, 1958; Uhlen *et al.*, 1984). Além disso, a SpA é capaz de ativar a coagulação intravascular via a sua ligação aos domínios A1 do fator de von Willebrand (Hartleib *et al.*, 2000). As proteínas plasmáticas, como o fibrinogénio e a fibronectina, atuam como pontes entre os estafilococos (CIfA e CIfB) e a integrina das plaquetas GPIIb/IIIa (O'Brien *et al.*, 2002), uma atividade que é suplementada através da associação da proteína A com o domínio A1 do vWF, o que permite que os estafilococos capturem as plaquetas através do recetor plaquetário GPIb- α (Foster, 2005; O'Seaghda *et al.*, 2006). A SpA também se liga ao TNFR1 e esta interação contribui para a patogénese da pneumonia estafilocócica (Gomez *et al.*, 2004). A SpA ativa a sinalização pró-inflamatória através da ativação mediada pelo TNFR1 do TRAF2, da cinase p38/c-Jun, da proteína cinase ativada por mitogénios (MAPK) e do fator de transcrição Rel NF-KB. A ligação da SpA induz ainda a perda (*shedding*) de TNFR1, uma atividade que parece necessitar da enzima de conversão do TNF (TACE) (Gomez *et al.*, 2007). Todas as atividades da SpA supracitadas são mediadas através dos seus cinco domínios de ligação às IgG e podem ser perturbadas pelas mesmas substituições de aminoácidos, inicialmente definidas pela sua necessidade para a interação entre a proteína A e a IgG1 humana (Cedergren *et al.*, 1993).

A SpA também atua como um superantigénio das células B ao capturar a região Fab da IgM portadora de VH3, o recetor das células B (Gomez *et al.*, 2007; Goodyear *et al.*, 2003; Goodyear and Silverman, 2004; Roben *et al.*, 1995). Após uma provocação intravenosa, as mutações na proteína A (SpA) de estafilococos revelam uma redução da carga estafilocócica nos tecidos de órgãos e uma capacidade drasticamente reduzida para formar abscessos (aqui descritos). Durante a infeção com *S. aureus* de tipo selvagem, formam-se abscessos no espaço de quarenta e oito

horas, que são detetáveis por microscopia ótica do tecido renal finamente seccionado e corado com hematoxilina-eosina, inicialmente marcados por um influxo de leucócitos polimorfonucleares (PMN). No dia 5 da infeção, os abscessos aumentaram de tamanho e delimitavam uma população central de estafilococos, rodeada por uma camada de material eosinofílico amorfo e um anel grande de PMN. A histopatologia revelou a existência de necrose massiva dos PMN na proximidade do nidus estafilocócico, no centro das lesões, bem como de um manto de fagócitos saudáveis. Os inventores também observaram uma coroa de PMN necróticos na periferia dos abscessos, contígua à pseudocápsula eosinofílica que separava o tecido renal saudável da lesão infecciosa. As variantes de estafilococos desprovidas de proteína A são incapazes de estabelecer as características histopatológicas dos abscessos e são eliminadas durante a infeção.

O'Seaghdha *et al.* (2006) descrevem estudos orientados no sentido de elucidar qual o subdomínio do domínio D que se liga ao vWF. Os autores produziram mutações únicas nos subdomínios de ligação quer a Fc quer a VH3, isto é, os resíduos de aminoácidos F5A, Q9A, Q10A, F13A, Y14A, L17A, N28A, I31A, K35A, G29A, F30A, S33A, D36A, D37A, Q40A, E47A, ou Q32A. Os autores constataram que o vWF se liga ao mesmo subdomínio que efetua a ligação ao segmento Fc. O'Seaghdha *et al.* definem o subdomínio do domínio D responsável pela ligação a vWF, mas são omissos quanto a qualquer utilização de substituições nos resíduos interactivantes para produzir um antigénio vacinal.

Uma proteína A recombinante e marcada por afinidade, um polipéptido que compreende os cinco domínios de ligação a IgG (EDCAB) (Sjodahl, 1977) mas é desprovido da região X C-terminal (Guss *et al.*, 1984), foi purificada a partir de *E. coli* recombinante e utilizada como um antigénio vacinal (Stranger-Jones *et al.*, 2006). Devido aos atributos da SpA ao ligar-se à porção Fc da IgG, não foi possível medir uma resposta imune humoral específica à proteína A (Stranger-Jones *et al.*, 2006). Os inventores ultrapassaram este obstáculo através da criação de SpA-DQ9,10K;D36,37A. Ratinhos BALB/c imunizados com a proteína A (SpA) recombinante mostraram uma protecção significativa contra a provocação intravenosa com estirpes de *S. aureus*: uma redução de 2,951 log da carga estafilocócica em

comparação com a proteína de tipo selvagem ($P > 0,005$; teste t de Student) (Stranger-Jones *et al.*, 2006). Os anticorpos específicos para a SpA podem dar origem a uma clearance fagocitária antes da formação dos abscessos e/ou influenciar a formação da barreira eosinofílica nos abscessos que separa as comunidades estafilocócicas das células imunes, uma vez que estes não se formam durante a infecção com estirpes mutantes da proteína A. Cada um dos cinco domínios da SpA (isto é, os domínios formados a partir dos feixes de três hélices e denominados E, D, A, B e C) apresenta propriedades de ligação similares (Jansson *et al.*, 1998). A solução e a estrutura cristalina do domínio D foram resolvidas com e sem os ligandos Fc e VH3 (Fab), que se ligam à Proteína A de uma forma não competitiva em locais distintos (Graille *et al.*, 2000). As mutações nos resíduos que se sabe estarem envolvidos na ligação a IgG (FS, Q9, Q10, S11, F13, Y14, L17, N28, I31 e K35) também são necessárias para a ligação ao domínio A1 do vWF e ao TNFR1 (Cedergren *et al.*, 1993; Gomez *et al.*, 2006; O'Seaghdha *et al.*, 2006), ao passo que os resíduos importantes para a interação com VH3 (Q26, G29, F30, S33, D36, D37, Q40, N43, E47) não parecem ter influência nas outras atividades de ligação (Graille *et al.*, 2000; Jansson *et al.*, 1998). A SpA visa especificamente um subconjunto de células B que expressam IgM relacionadas com a família VH3 na sua superfície, isto é, recetores de células B do tipo VH3 (Roben *et al.*, 1995). Ao interagirem com a SpA, estas células B proliferam e entregam-se à apoptose, conduzindo a uma eliminação preferencial e prolongada dos linfócitos B do tipo inato (ou seja, células B da zona marginal e células B2 foliculares) (Goodyear *et al.*, 2003; Goodyear *et al.*, 2004).

Base molecular da apresentação à superfície e da função da proteína A. A proteína A é sintetizada como um precursor no citoplasma bacteriano e é segregada via o seu péptido sinal YSIRK ao nível da parede transversal, isto é, o septo de divisão celular de estafilococos (FIG. 1) (DeDent *et al.*, 2007; DeDent *et al.*, 2008). Após clivagem do sinal de endereçamento LPXTG C-terminal, a proteína A é ancorada a reticulações do peptidoglicano bacteriano pela sortase A (Mazmanian *et al.*, 1999; Schneewind *et al.*, 1995; Mazmanian *et al.*, 2000). A proteína A é a proteína de superfície de estafilococos mais abundante; a molécula é expressa virtualmente por todas as

estirpes de *S. aureus* (Cespedes *et al.*, 2005; Kennedy *et al.*, 2008; Said-Salim *et al.*, 2003). Os estafilococos regeneram 15-20% da sua parede celular por ciclo de divisão (Navarre and Schneewind, 1999). As hidrolases murinas clivam as cadeias de glicano e os péptidos do peptidoglicano, libertando, assim, para o meio extracelular a proteína A com o seu tetrapéptido-dissacarídeo da parede celular C-terminal acoplado (Ton-That *et al.*, 1999). Assim, por desígnio fisiológico, a proteína A encontra-se ancorada à parede celular e apresentada na superfície bacteriana, mas também é libertada para os tecidos circundantes durante a infeção do hospedeiro (Marraffini *et al.*, 2006).

A proteína A captura as imunoglobulinas na superfície bacteriana, e esta atividade bioquímica permite a fuga estafilocócica às respostas imunes inata e adquirida do hospedeiro (Jensen, 1958; Goodyear *et al.*, 2004). De forma interessante, a região X da proteína A (Guss *et al.*, 1984), um domínio de repetição que une os domínios de ligação às IgG ao sinal de endereçamento LPXTG/âncora da parede celular, é talvez a porção mais variável do genoma estafilocócico (Said-Salim, 2003; Schneewind *et al.*, 1992). Cada um dos cinco domínios de ligação às imunoglobulinas da proteína A (SpA), formados por feixes de três hélices e denominados E, D, A, B e C, apresenta propriedades estruturais e funcionais similares (Sjodahl, 1977; Jansson *et al.*, 1998). A solução e a estrutura cristalina do domínio D foram resolvidas com e sem os ligandos Fc e V_H3 (Fab), que se ligam à Proteína A de uma forma não competitiva em locais distintos (Graille 2000).

No complexo da estrutura cristalina, o fragmento Fab interage com a hélice II e a hélice III do domínio D por meio de uma superfície constituída por quatro cadeias β da região VH (Graille 2000). O eixo principal da hélice II do domínio D faz um ângulo de aproximadamente 50° com a orientação das cadeias e a porção inter-helicoidal do domínio D está mais próxima da cadeia C0. O local de interação no fragmento Fab é distante da região constante de cadeia pesada e da cadeia leve da imunoglobulina. A interação envolve os seguintes resíduos do domínio D: Asp-36 da hélice II, Asp-37 e Gln-40 na volta entre a hélice II e a hélice III e vários outros resíduos (Graille 2000). Ambas as superfícies interatuantes são

predominantemente constituídas por cadeias laterais polares, com três resíduos carregados negativamente no domínio D e dois resíduos carregados positivamente no 2A2 Fab enterrados pela interação, proporcionando uma atração eletrostática global entre as duas moléculas. Das cinco interações polares identificadas entre o fragmento Fab e o domínio D, três são entre cadeias laterais. Estabelece-se uma ponte salina entre Arg-H19 e Asp-36 e duas ligações de hidrogénio entre Tyr-H59 e Asp-37 e entre Asn-H82a e Ser-33. Devido à conservação de Asp-36 e Asp-37 na totalidade dos cinco domínios de ligação às IgG da proteína A, os inventores mutaram estes resíduos.

Os locais em SpA-D responsáveis pela ligação ao fragmento Fab estão estruturalmente separados da superfície do domínio que medeia a ligação a Fc γ . A interação de Fc γ com o domínio D envolve principalmente resíduos na hélice I, com um menor envolvimento da hélice II (Gouda *et al.*, 1992; Deisenhofer, 1981). Com exceção do resíduo Gln-32, que representa um contacto secundário em ambos os complexos, nenhum dos resíduos que medeia a interação com Fc γ está envolvido na ligação a Fab. Para analisar a relação espacial entre estes diferentes locais de ligação às imunoglobulinas, sobrepueraram-se os domínios da SpA nestes complexos para construir um modelo de um complexo entre Fab, o SpA-domínio D e a molécula Fc γ . Neste modelo ternário, os fragmentos Fab e Fc γ formam uma sanduiche em faces opostas da hélice II, sem sinais de impedimento estéreo de qualquer uma das interações. Estas constatações ilustram a forma como, apesar do seu tamanho reduzido (isto é, 56-61 aa), um domínio da SpA pode exibir simultaneamente ambas as atividades, explicando as observações experimentais de que as interações do fragmento Fab com um domínio individual são não competitivas. Os resíduos para a interação entre SpA-D e Fc γ são Gln-9 e Gln-10.

Em contraste, a ocupação do domínio D por parte da porção Fc das IgG bloqueia a sua interação com o domínio A1 do vWF e provavelmente também com o TNFR1 (O'Seaghdha *et al.*, 2006). As mutações nos resíduos essenciais para a ligação ao fragmento Fc das IgG (F5, Q9, Q10, S11, F13, Y14, L17, N28, I31 e K35) também são necessárias para a ligação ao domínio A1 do vWF e ao TNFR1 (O'Seaghdha *et al.*, 2006; Cedergren *et al.*, 1993; Gomez *et al.*, 2006), ao passo que os resíduos críticos para a

interação com VH3 (Q26, G29, F30, S33, D36, D37, Q40, N43, E47) não têm qualquer impacto nas atividades de ligação de Fc IgG, A1 vWF ou TNFR1 (Jansson *et al.*, 1998; Graille *et al.*, 2000). A atividade de ligação da proteína A ao fragmento Fab das imunoglobulinas visa um subconjunto de células B que expressam IgM relacionadas com a família VH3 na sua superfície, isto é, estas moléculas atuam como recetores das células B do tipo VH3 (Roben *et al.*, 1995). Ao interagirem com a SpA, estas células B proliferam rapidamente e depois entregam-se à apoptose, conduzindo a uma eliminação preferencial e prolongada dos linfócitos B do tipo inato (ou seja, células B da zona marginal e células B2 foliculares) (Goodyear and Silverman, 2004; Goodyear and Silverman, 2003). Mais de 40% das células B circulantes são visadas pela interação da proteína A, e a família VH3 representa a maior família de recetores das células B humanas que confere respostas humorais protetoras contra organismos patogénicos (Goodyear and Silverman, 2004; Goodyear and Silverman, 2003). Assim, a proteína A atua de forma análoga aos superantígenos de estafilococos (Roben *et al.*, 1995), se bem que esta última classe de moléculas, por exemplo SEB, TSST-1, TSST-2, forma complexos com o recetor das células T para estimular inapropriadamente respostas imunes no hospedeiro, precipitando, dessa forma, vertentes características das infeções estafilocócicas (Roben *et al.*, 1995; Tiedemann *et al.*, 1995). No seu conjunto, estas constatações documentam as contribuições da proteína A para o estabelecimento das infeções estafilocócicas e para a modulação das respostas imunes do hospedeiro.

Em suma, os domínios da proteína A podem ser encarados como possuindo duas interfaces diferentes para a ligação a moléculas do hospedeiro, e qualquer desenvolvimento de vacinas à base da proteína A necessita de considerar a produção de variantes que não perturbem a sinalização celular, a agregação plaquetária, a captura de imunoglobulinas ou a indução da proliferação e apoptose das células B no hospedeiro. Tais variantes da proteína A também deverão ser úteis ao analisar as vacinas quanto à respetiva capacidade de produção de anticorpos que bloqueiem as atividades da SpA supracitadas e ocupem os cinco domínios de repetição ao nível das suas interfaces de ligação duplas. Este objetivo é aqui articulado

e procurado pela primeira vez, descrevendo-se métodos em pormenor para a produção de variantes da proteína A que podem ser usadas como uma vacina segura nos seres humanos. Para perturbar a ligação ao fragmento Fc γ das IgG, ao domínio A1 do vWF e ao TNFR1, as glutaminas (Q) 9 e 10 [numeração derivada do domínio D da SpA conforme descrita em Uhlen *et al.*, 1984] foram mutadas e geraram-se substituições por lisina em ambas as glutaminas, na expectativa de estas abolirem os atributos de ligando ao nível da primeira interface de ligação. Para perturbar a ligação a V_H3 Fab das IgM, mutaram-se os aspartatos (D) 36 e 37, em que cada um deles é necessário para a associação ao recetor das células B. D36 e D37 foram ambos substituídos por alanina. As mutações Q9,10K e D36,37A são combinadas na molécula recombinante SpA-DQ9,10K-;D36,37A e testadas relativamente aos atributos de ligação da proteína A. Adicionalmente, as espécies SpA-D e SpA-DQ9,10K;D36,37A são sujeitas a estudos de imunização em ratinhos e coelhos e analisadas quanto a [1] produção de anticorpos específicos (Ac SpA-D); [2] capacidade dos Ac SpA-D para bloquear a associação entre a proteína A e os seus quatro ligandos diferentes e [3] atributos dos Ac SpA-D para produzir imunidade protetora contra as infeções estafilocócicas (ver a secção Exemplos abaixo).

B. Coagulases de estafilococos

As coagulases são enzimas produzidas pelas bactérias *Staphylococcus* que convertem o fibrinogénio em fibrina. A Coa e a vW_h ativam a protrombina sem proteólise (Friedrich *et al.*, 2003). O complexo coagulase-protrombina reconhece o fibrinogénio como um substrato específico, convertendo-o diretamente em fibrina. A estrutura cristalina do complexo ativo revelou uma ligação dos domínios D1 e D2 à protrombina e a inserção da sua extremidade N-terminal Ile¹-Val² no bolso Ile¹⁶, induzindo um sítio ativo funcional no zimogénio através de modificação conformacional (Friedrich *et al.*, 2003). O exossítio I da α -trombina, o local de reconhecimento do fibrinogénio, e o proexossítio I na protrombina estão bloqueados pelo D2 da Coa (Friedrich *et al.*, 2003). Contudo, a associação do complexo (Coa-protrombina)₂ tetramérico liga o fibrinogénio num local novo com alta afinidade (Panizzi *et al.*, 2006). Este modelo explica as propriedades coagulantes e

a conversão eficiente do fibrinogénio pela coagulase (Panizzi *et al.*, 2006).

O fibrinogénio é uma glicoproteína grande ($M_r \sim 340.000$), formada por três pares de cadeias $A\alpha$, $B\beta$ e γ ligados covalentemente para formar um "dímero de trímeros", onde A e B designam os fibrinopéptidos libertados pela clivagem com trombina (Panizzi *et al.*, 2006). A molécula alongada enrola-se em três domínios separados: um fragmento E central que contém as extremidades N-terminais da totalidade das seis cadeias e dois fragmentos D flanqueantes constituídos essencialmente pelas extremidades C-terminais das cadeias $B\beta$ e γ . Estes domínios globulares estão ligados por estruturas compridas de tripla hélice. Os complexos coagulase-protrombina, que convertem o fibrinogénio humano na fibrina autopolimerizável, não são visados pelos inibidores da trombina circulante (Panizzi *et al.*, 2006). Assim, as coagulases de estafilococos contornam a via de coagulação sanguínea fisiológica.

Todas as estirpes de *S. aureus* segregam coagulase e vWbp (Bjerketorp *et al.*, 2004; Field and Smith, 1945). Embora os trabalhos iniciais referissem contribuições importantes da coagulase para a patogénese das infeções estafilocócicas (Ekstedt and Yotis, 1960; Smith *et al.*, 1947), investigações mais recentes com ferramentas de genética molecular questionaram esta perspetiva ao não observarem fenótipos de virulência com modelos de endocardite, abscessos cutâneos e mastite em ratinhos (Moreillon *et al.*, 1995; Phonimdaeng *et al.*, 1990). Gerando variantes isogénicas de *S. aureus* Newman, um isolado clínico totalmente virulento (Duthie *et al.*, 1952), descreve-se aqui que os mutantes *coa* apresentam efetivamente defeitos ao nível da virulência num modelo de bacteriemia letal e abscessos renais em ratinhos. Na experiência dos inventores, a estirpe *S. aureus* 8325-4 não é totalmente virulenta, presumindo-se que as lesões mutacionais nesta estirpe não sejam capazes de revelar defeitos ao nível da virulência *in vivo*. Além disso, os anticorpos produzidos contra *Coa* ou vWbp perturbam a patogénese das infeções por *S. aureus* Newman numa extensão equivalente ao impacto das deleções génicas. A *Coa* e a vWbp contribuem para a formação dos abscessos estafilocócicos

e a bacteriemia letal e também poderão atuar como antigénios protetores em vacinas subunitárias.

Os estudos bioquímicos documentam o valor biológico dos anticorpos contra Coa e vWbp. Ao ligarem o antigénio e bloquearem a sua associação aos fatores de coagulação, os anticorpos previnem a formação dos complexos Coa-protrombina e vWbp-protrombina. Os estudos de transferência passiva revelaram uma proteção dos animais experimentais contra a formação de abscessos estafilocócicos e a provocação letal por anticorpos anti-Coa e anti-vWbp. Assim, os anticorpos neutralizantes de Coa e vWbp geram uma proteção imune contra a doença estafilocócica.

Estudos prévios revelaram a necessidade da coagulase para resistir à fagocitose no sangue (Smith *et al.*, 1947), e os inventores observaram um fenótipo similar para os mutantes Δ coa em sangue de ratinho tratado com lepirudina (ver o Exemplo 3 abaixo). Como a vWbp apresenta maior afinidade para a protrombina humana do que para a homóloga de ratinho, suspeita-se que o mesmo possa acontecer para as variantes Δ vWbp no sangue humano. Além disso, a expressão de Coa e vWbp nos abscessos, assim como a sua distribuição surpreendente na pseudocápsula eosinofílica que rodeia as comunidades do abscesso estafilocócico ou na parede periférica de fibrina, sugerem que as coagulases segregadas contribuem para o estabelecimento destas lesões. Esta hipótese foi testada e, de facto, os mutantes Δ coa mostraram-se defeituosos em termos do estabelecimento de abscessos. Um teste correspondente, que bloqueia a função da Coa com anticorpos específicos, produziu o mesmo efeito. Consequentemente, é proposto que a coagulação da fibrina é um acontecimento crítico no estabelecimento dos abscessos estafilocócicos que podem ser visados para o desenvolvimento de vacinas protetoras. Devido à sua sobreposição de funções na protrombina humana, tanto a Coa como a vWbp são consideradas excelentes candidatas para o desenvolvimento de vacinas.

C. Outros antigénios de estafilococos

A investigação efetuada ao longo das últimas décadas identificou exotoxinas, proteínas de superfície e moléculas

reguladoras de *S. aureus* como fatores importantes de virulência (Foster, 2005; Mazmanian et al., 2001; Novick, 2003). Fez-se muito progresso relativamente à regulação destes genes. Por exemplo, os estafilococos realizam um censo bacteriano através da secreção de péptidos autoindutores que se ligam a um recetor cognato a uma concentração de limiar, ativando desta forma reações de transferência de fosfato (*phosphorelay*) e a ativação transcricional de muitos dos genes de exotoxinas (Novick, 2003). A patogénese das infeções estafilocócicas assenta nestes fatores de virulência (exotoxinas segregadas, exopolissacarídeos e adesinas de superfície). O desenvolvimento de vacinas estafilocócicas é travado pela natureza multifacetada dos mecanismos de invasão estafilocócica. Está bem estabelecido que os microrganismos vivos atenuados constituem vacinas extremamente eficazes; as respostas imunes desencadeadas por estas vacinas são frequentemente de maior magnitude e maior duração que aquelas produzidas por imunogénios não replicantes. Uma explicação para esta constatação poderá ser o facto de as estirpes vivas atenuadas estabelecerem infeções limitadas no hospedeiro e mimetizarem as etapas iniciais da infeção natural. As concretizações do invento referem-se a composições e métodos que incluem polipéptidos e péptidos variantes da SpA, assim como outras proteínas, polipéptidos e péptidos extracelulares imunogénicos (incluindo proteínas ou péptidos tanto segregados como de superfície celular) de bactérias gram-positivas, para utilização na mitigação ou na imunização contra a infeção. Em concretizações particulares, a bactéria é uma bactéria do tipo estafilococos. As proteínas, polipéptidos ou péptidos extracelulares incluem, mas não estão limitados a, proteínas segregadas e de superfície celular das bactérias visadas.

O organismo patogénico humano *S. aureus* segrega EsxA e EsxB, duas proteínas do tipo ESAT-6, à volta do envelope bacteriano (Burts et al., 2005, que é aqui incorporado por meio de referência). Os genes *esxA* e *esxB* de estafilococos estão agrupados com seis outros genes na ordem de transcrição: *esxA esaA esaB esaC esaD esaE esaF esxB*. Os acrónimos *esa*, *ess* e *esx* significam secreção de ESAT-6 (*es*): acessória (*a*), sistema (*s*) e extracelular (*x*), respetivamente, dependendo de as proteínas codificadas desempenharem um papel acessório (*esa*) ou direto (*ess*) na secreção ou serem segregadas (*esx*) no

meio extracelular. O aglomerado completo de oito genes é aqui designado por aglomerado Ess. EsxA, esxB, essA, essB e essC são todos necessários para a síntese ou secreção de EsxA e EsxB. Os mutantes que não conseguem produzir EsxA, EsxB e EssC apresentam defeitos ao nível da patogénese dos abscessos murinos de *S. aureus*, sugerindo que este sistema de secreção especializado poderá ser uma estratégia geral da patogénese bacteriana humana. A secreção de substratos não-WXG100 pela via ESX-1 foi referida para vários antigénios, incluindo EspA, EspB, Rv3483c e Rv3615c (Fortune *et al.*, 2005; MacGurn *et al.*, 2005; McLaughlin *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2007). Foi também demonstrado que a via ESX-5 alternativa segrega tanto proteínas WXG100 como não-WXG100 em micobactérias patogénicas (Abdallah *et al.*, 2007; Abdallah *et al.*, 2006).

A via Ess de *Staphylococcus aureus* pode ser encarada como um módulo de secreção equipado com componentes de transporte especializados (Ess), fatores acessórios (Esa) e substratos de secreção cognatos (Esx). EssA, EssB e EssC são necessárias para a secreção de EsxA e EsxB. Como se prevê que EssA, EssB e EssC sejam proteínas transmembranares, pondera-se que estas proteínas formem um aparelho de secreção. Algumas das proteínas no aglomerado de genes ess poderão transportar ativamente os substratos segregados (atuando como motor) ao passo que outras poderão regular o transporte (regulador). A regulação poderá ser obtida mediante, embora não precise de estar limitada a, mecanismos transcricionais ou pós-traducionais para os polipéptidos segregados, o endereçamento de substratos específicos para locais definidos (por exemplo, meio extracelular ou células hospedeiras) ou o *timing* de eventos de secreção durante a infeção. Neste momento, não é claro se todas as proteínas Esx segregadas atuam como toxinas ou contribuem indiretamente para a patogénese.

Os estafilococos confiam na adesão às células hospedeiras mediada por proteínas de superfície ou na invasão dos tecidos como estratégia de fuga às defesas imunes. Além disso, *S. aureus* utiliza proteínas de superfície para capturar ferro do hospedeiro durante a infeção. A maioria das proteínas de superfície envolvidas na patogénese estafilocócica transporta sinais de endereçamento C-terminais, isto é, são ligados covalentemente ao envelope da parede celular por uma sortase.

Adicionalmente, as estirpes estafilocócicas desprovidas dos genes necessários para a ancoragem de proteínas de superfície, ou seja, a sortase A e B, apresentam um defeito dramático ao nível da virulência em vários modelos de ratinho de doença diferentes. Assim, os antigénios do tipo proteínas de superfície constituem um alvo vacinal validado, uma vez que os genes correspondentes são essenciais para o desenvolvimento da doença estafilocócica e podem ser explorados em várias concretizações do invento. A superfamília de enzimas sortase consiste em transpeptidases Gram-positivas responsáveis pela ancoragem dos fatores de virulência do tipo proteínas de superfície à camada de peptidoglicano da parede celular. Foram identificadas duas isoformas de sortases em *Staphylococcus aureus*: SrtA e SrtB. Foi demonstrado que estas enzimas reconhecem um motivo LPXTG nas proteínas que constituem o seu substrato. A isoforma SrtB parece ser importante na aquisição de ferro heme e na homeostasia do ferro, ao passo que a isoforma SrtA desempenha um papel crítico na patogénese das bactérias Gram-positivas, ao modular a capacidade da bactéria para aderir ao tecido do hospedeiro via a ancoragem covalente de adesinas e outras proteínas ao peptidoglicano da parede celular. Em determinadas concretizações, as variantes da SpA aqui descritas podem ser usadas em combinação com outras proteínas de estafilococos, tais como as proteínas Coa, Eap, Ebh, Emp, EsaC, EsaB, EsxA, EsxB, Hla, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, IsdC, SasF, vWbp e/ou vWh.

Determinados aspetos do invento incluem métodos e composições relacionados com composições proteínáceas que compreendem polipéptidos, péptidos ou ácidos nucleicos codificando variante(s) da SpA e outros antigénios de estafilococos, tais como outras proteínas transportadas pela via Ess ou substratos da sortase. Estas proteínas poderão ser modificadas por deleção, inserção e/ou substituição.

Os polipéptidos Esx incluem a sequência de aminoácidos das proteínas Esx de bactérias do género *Staphylococcus*. A sequência de Esx poderá ser de uma espécie particular de estafilococos, como *Staphylococcus aureus*, e poderá ser de uma estirpe particular, como Newman. Em determinadas concretizações, a sequência de EsxA é SAV0282 da estirpe Mu50 (que é a mesma sequência de aminoácidos para Newman) e pode

ser acedida utilizando o número de acesso do Genbank Q99WU4 (gi|68565539). Noutras concretizações, a sequência de EsxB é SAV0290 da estirpe Mu50 (que é a mesma sequência de aminoácidos para Newman) e pode ser acedida utilizando o número de acesso do Genbank Q99WT7 (gi|68565532). Em concretizações adicionais, é possível utilizar outros polipéptidos transportados pela via Ess, cujas sequências poderão ser identificadas por um perito na especialidade utilizando bases de dados e recursos acessíveis na Internet.

Os polipéptidos que constituem substratos da sortase incluem, embora não exclusivamente, a sequência de aminoácidos das proteínas SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, IsdC ou SasF de bactérias do género *Staphylococcus*. A sequência do polipéptido que constitui um substrato da sortase poderá ser de uma espécie particular de estafilococos, como *Staphylococcus aureus*, e poderá ser de uma estirpe particular, como Newman. Em determinadas concretizações, a sequência de SdrD é da estirpe N315 e pode ser acedida utilizando o número de acesso do Genbank NP_373773.1 (gi|15926240). Noutras concretizações, a sequência de SdrE é da estirpe N315 e pode ser acedida utilizando o número de acesso do Genbank NP_373774.1 (gi|15926241). Noutras concretizações, a sequência de IsdA é SAV1130 da estirpe Mu50 (que é a mesma sequência de aminoácidos para Newman) e pode ser acedida utilizando o número de acesso do Genbank NP_371654.1 (gi|15924120). Noutras concretizações, a sequência de IsdB é SAV1129 da estirpe Mu50 (que é a mesma sequência de aminoácidos para Newman) e pode ser acedida utilizando o número de acesso do Genbank NP_371653.1 (gi|15924119). Em concretizações adicionais, é possível utilizar outros polipéptidos transportados pela via Ess ou processados pela sortase, cujas sequências poderão ser identificadas por um perito na especialidade utilizando bases de dados e recursos acessíveis na Internet.

Exemplos de várias proteínas que podem ser usadas no contexto do presente invento podem ser identificados por meio de análise das submissões de genomas bacterianos em bases de dados, incluindo, mas não exclusivamente, os números de acesso NC_002951 (GI:57650036 e GenBank CP000046), NC_002758 (GI:57634611 e GenBank BA000017), NC_002745 (GI:29165615 e GenBank BA000018), NC_003923 (GI:21281729 e GenBank BA000033),

NC_002952 (GI:49482253 e GenBank BX571856), NC_002953 (GI:49484912 e GenBank BX571857), NC_007793 (GI:87125858 e GenBank CP000255), NC_007795 (GI:87201381 e GenBank CP000253).

Tal como o termo é aqui utilizado, uma "proteína" ou "polipéptido" refere-se a uma molécula compreendendo pelo menos dez resíduos de aminoácidos. Nalgumas concretizações, utiliza-se uma versão de tipo selvagem de uma proteína ou polipéptido. Contudo, em muitas concretizações do invento, utiliza-se uma proteína ou polipéptido modificado para gerar uma resposta imune. Os termos descritos acima poderão ser empregues indistintamente. Uma "proteína modificada" ou "polipéptido modificado" ou uma "variante" refere-se a uma proteína ou polipéptido cuja estrutura química, particularmente a sua sequência de aminoácidos, está alterada em relação à proteína ou polipéptido de tipo selvagem. Nalgumas concretizações, uma proteína ou polipéptido modificado/variante possui pelo menos uma atividade ou função modificada (reconhecendo-se que as proteínas ou polipéptidos poderão ter múltiplas atividades ou funções). Está especificamente contemplado que uma proteína ou polipéptido modificado/variante possa estar alterado em relação a uma atividade ou função, mas conserve uma atividade ou função de tipo selvagem noutros aspetos, como a imunogenicidade.

Em determinadas concretizações, o tamanho de uma proteína ou polipéptido (tipo selvagem ou modificado) poderá compreender, mas não está limitado a, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775, 800, 825, 850, 875, 900, 925, 950, 975, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1750, 2000, 2250, 2500 ou mais moléculas amino, e qualquer intervalo daí derivável, ou derivado de uma sequência amino correspondente aqui descrita ou referenciada. Está contemplado que os polipéptidos possam ser mutados por

truncamento, tornando-os mais curtos do que a sua forma de tipo selvagem correspondente, mas também que possam ser alterados mediante a fusão ou conjugação com uma sequência proteica heteróloga com uma função particular (por exemplo, para direcionamento ou localização, para uma imunogenicidade reforçada, para efeitos de purificação, etc.).

Tal como o termo é aqui utilizado, uma "molécula amino" refere-se a qualquer aminoácido, derivado de aminoácido ou mimético de aminoácido conhecido na técnica. Em determinadas concretizações, os resíduos da molécula proteínácea são sequenciais, sem qualquer molécula de tipo não-amino a interromper a sequências de resíduos de moléculas amino. Noutras concretizações, a sequência poderá compreender um ou mais grupos de moléculas de tipo não-amino. Em concretizações particulares, a sequência de resíduos da molécula proteínácea poderá estar interrompida por um ou mais grupos de moléculas de tipo não-amino.

Por conseguinte, o termo "composição proteínácea" engloba sequências de moléculas amino compreendendo pelo menos um dos 20 aminoácidos comuns em proteínas sintetizadas naturalmente, ou pelo menos um aminoácido modificado ou pouco usual.

As composições proteínáceas poderão ser produzidas por qualquer técnica conhecida pelos peritos na especialidade, incluindo (i) a expressão de proteínas, polipéptidos ou péptidos através de técnicas de biologia molecular padrão, (ii) o isolamento de compostos proteínáceos a partir de fontes naturais ou (iii) a síntese química de materiais proteínáceos. As sequências nucleotídicas, assim como as sequências proteicas, polipeptídicas e peptídicas para vários genes foram previamente divulgadas e poderão ser encontradas nas bases de dados computadorizadas reconhecidas. Uma dessas bases de dados são as bases de dados Genbank e GenPept do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (na Internet em ncbi.nlm.nih.gov/). As regiões codificantes destes genes poderão ser amplificadas e/ou expressas utilizando as técnicas aqui divulgadas ou formas conhecidas pelos peritos na especialidade.

As variantes ao nível da sequência de aminoácidos da SpA, coagulases e outros polipéptidos do invento poderão ser variantes de substituição, inserção ou deleção. Uma variação num polipéptido do invento poderá afetar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 ou mais aminoácidos contíguos ou não contíguos do polipéptido, em comparação com o tipo selvagem. Uma variante pode compreender uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 50%, 60%, 70%, 80% ou 90%, incluindo todos os valores e intervalos intermédios, idêntica a qualquer sequência aqui disponibilizada ou referenciada, por exemplo, SEQ ID NO:2-8 ou SEQ ID NO:11-30. Uma variante pode incluir 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais aminoácidos substitutos. A utilização de um polipéptido processado ou segregado pela via Ess ou de outras proteínas de superfície (ver a Tabela 1) ou de substratos da sortase oriundos de qualquer espécie e estirpe de estafilococos, em composições e métodos aqui descritos, está contemplada.

As variantes de deleção são tipicamente desprovidas de um ou mais resíduos da proteína nativa ou de tipo selvagem. É possível eliminar resíduos individuais ou um certo número de aminoácidos contíguos. Pode introduzir-se um codão stop (por substituição ou inserção) numa sequência de ácidos nucleicos codificante para gerar uma proteína truncada. Os mutantes de inserção normalmente envolvem a adição de material num ponto não terminal do polipéptido. Isto poderá incluir a inserção de um ou mais resíduos. Também é possível gerar adições terminais, que recebem o nome de proteínas de fusão. Estas proteínas de fusão incluem multímeros ou concatâmeros de um ou mais péptidos ou polipéptidos aqui descritos ou referenciados.

As variantes de substituição compreendem tipicamente a troca de um aminoácido por outro num ou mais sítios da proteína, e poderão ser concebidas para modular uma ou mais propriedades do polipéptido, com ou sem a perda de outras funções ou propriedades. As substituições poderão ser conservativas, isto é, um aminoácido é substituído por outro de forma e carga similares. As substituições conservativas são bem conhecidas na técnica e incluem, por exemplo, as trocas

de: alanina por serina; arginina por lisina; asparagina por glutamina ou histidina; aspartato por glutamato; cisteína por serina; glutamina por asparagina; glutamato por aspartato; glicina por prolina; histidina por asparagina ou glutamina; isoleucina por leucina ou valina; leucina por valina ou isoleucina; lisina por arginina; metionina por leucina ou isoleucina; fenilalanina por tirosina, leucina ou metionina; serina por treonina; treonina por serina; triptofano por tirosina; tirosina por triptofano ou fenilalanina; e valina por isoleucina ou leucina. Em alternativa, as substituições poderão ser não conservativas, de modo que uma função ou atividade do polipéptido é afetada. As trocas não conservativas envolvem normalmente a substituição de um resíduo por outro que é quimicamente diferente, tal como um aminoácido polar ou carregado por um aminoácido não polar ou não carregado, e vice-versa.

Tabela 1. Exemplos de proteínas de superfície de estirpes de *S. aureus*

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

SAV n.º	SA n.º	Superfície	MW2	Mu50	N315	Newman	MRSA252*	MSSA476*
SAV1731	SA1552	SasI	895	891	891	891	534	895
SAV1129	SA0976	SasJ/IsdB	645	645	645	645	652	645
	SA2381	SasK	198	211	211	-	-	197
	Np	SasL	-	232	-	-	-	-
SAV1131	SA0978	IsdC	227	227	227	227	227	227

As proteínas do invento poderão ser recombinantes ou sintetizadas *in vitro*. Em alternativa, uma proteína recombinante ou não recombinante poderá ser isolada a partir de bactérias. Está igualmente contemplado que uma bactéria contendo tal variante possa ser implementada em composições e métodos do invento. Por conseguinte, uma proteína não precisa de ser isolada.

O termo "codão funcionalmente equivalente" é aqui utilizado para designar os codões que codificam o mesmo aminoácido, tais como os seis codões para a arginina ou a serina, e também designa os codões que codificam aminoácidos biologicamente equivalentes (ver a Tabela 2, abaixo).

Tabela 2. Tabela de codões

Aminoácidos				Codões
Alanina	Ala	A		GCA GCC GCG GCU
Cisteína	Cys	C		UGC UGU
Ácido aspártico	Asp	D		GAC GAU
Ácido glutâmico	Glu	E		GAA GAG
Fenilalanina	Phe	F		UUC UUU
Glicina	Gly	G		GGA GGC GGG GGU
Histidina	His	H		CAC CAU
Isoleucina	Ile	I		AUA AUC AUU
Lisina	Lys	K		AAA AAG
Leucina	Leu	L		UUA UUG CUA CUC CUG CUU
Metionina	Met	M		AUG
Asparagina	Asn	N		AAC AAU
Prolina	Pro	P		CCA CCC CCG CCU
Glutamina	Gln	Q		CAA CAG

Aminoácidos			Codões
Arginina	Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
Serina	Ser	S	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
Treonina	Thr	T	ACA ACC ACG ACU
Valina	Val	V	GUA GUC GUG GUU
Triptofano	Trp	W	UGG
Tirosina	Tyr	Y	UAC UAU

Entender-se-á igualmente que as sequências de aminoácidos e ácidos nucleicos poderão incluir resíduos adicionais, tais como aminoácidos N- ou C-terminais adicionais ou sequências 5' ou 3' adicionais, respetivamente, e ainda serem essencialmente conforme apresentadas numa das sequências aqui divulgadas, desde que a sequência satisfaça os critérios expostos acima, incluindo a manutenção da atividade biológica da proteína (por exemplo, a imunogenicidade), no que diz respeito à expressão da proteína. A adição de sequências terminais aplica-se particularmente às sequências de ácidos nucleicos, que poderão, por exemplo, incluir várias sequências não codificantes flanqueando qualquer uma das porções 5' ou 3' da região codificante.

O que se segue é uma discussão baseada na modificação dos aminoácidos de uma proteína para criar um polipéptido ou péptido variante. Por exemplo, determinados aminoácidos poderão ser substituídos por outros aminoácidos numa estrutura proteica, com ou sem perda apreciável da capacidade de ligação interativa com estruturas como, por exemplo, as regiões de ligação ao antigénio de anticorpos ou os sítios de ligação em moléculas de substrato. Como é a capacidade interativa e a natureza de uma proteína que definem a atividade funcional dessa proteína, é possível efetuar determinadas substituições de aminoácidos numa sequência proteica, e na sua sequência de ADN codificante subjacente, e ainda assim produzir uma proteína com uma propriedade desejável. A possibilidade de efetuar várias modificações nas sequências de ADN dos genes é, pois, contemplada pelos inventores.

Está contemplado que, nas composições do invento, exista entre cerca de 0,001 mg e cerca de 10 mg de polipéptido,

péptido e/ou proteína total por ml. A concentração de proteína numa composição pode ser cerca de, pelo menos cerca de ou não mais de cerca de 0,001; 0,010; 0,050; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0; 9,5; 10,0 mg/ml ou mais (ou qualquer intervalo daí derivável). Desta, cerca de, pelo menos cerca de ou não mais de cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100% poderá ser uma variante da SpA ou uma coagulase e poderá ser usada em combinação com outros péptidos ou polipéptidos, tais como outros péptidos e/ou antigénios bacterianos.

O presente invento contempla a administração de polipéptidos ou péptidos variantes da SpA para realizar uma terapia preventiva ou obter um efeito terapêutico contra o desenvolvimento de uma doença ou afeção associada à infeção por um organismo patogénico do tipo estafilococos.

Em determinados aspetos, utilizam-se combinações de antigénios de estafilococos na produção de uma composição imunogénica que é eficaz no tratamento ou prevenção da infeção estafilocócica. As infeções estafilocócicas progridem através de várias etapas diferentes. Por exemplo, o ciclo de vida estafilocócico envolve a colonização pelo parasita, a iniciação da infeção mediante o acesso a tecidos adjacentes ou à corrente sanguínea e/ou a multiplicação anaeróbica no sangue. A interação entre os determinantes de virulência de *S. aureus* e os mecanismos de defesa do hospedeiro pode induzir complicações, tais como endocardite, formação de abscessos metastáticos e síndrome de sépsis. Diferentes moléculas na superfície da bactéria estão envolvidas em diferentes passos do ciclo de infeção. As combinações de determinados antigénios podem desencadear uma resposta imune que protege contra diferentes etapas da infeção estafilocócica. A eficácia da resposta imune pode ser medida em ensaios com modelos animais e/ou utilizando um ensaio de opsonofagocitose.

D. Polipéptidos e produção de polipéptidos

O presente invento descreve polipéptidos, péptidos, proteínas e seus fragmentos imunogénicos para utilizar em várias concretizações do presente invento. Por exemplo, polipéptidos específicos são analisados quanto a uma resposta imune ou utilizados para desencadear uma resposta imune. Em concretizações específicas, a totalidade ou parte das proteínas do invento também podem ser sintetizadas em solução ou num suporte sólido de acordo com técnicas convencionais. Encontram-se disponíveis comercialmente vários sintetizadores automáticos que podem ser usados de acordo com protocolos conhecidos. Ver, por exemplo, Stewart & Young, (1984); Tam *et al.*, (1983); Merrifield, (1986); e Barany & Merrifield (1979).

Em alternativa, é possível utilizar a tecnologia de ADN recombinante, em que uma sequência nucleotídica que codifica um péptido do invento é inserida num vetor de expressão, transformada ou transfetada numa célula hospedeira apropriada e cultivada em condições adequadas para ocorrer expressão.

Uma concretização do invento inclui o uso da transferência génica para células, incluindo microrganismos, para a produção e/ou apresentação de polipéptidos ou péptidos. O gene para o polipéptido ou péptido de interesse poderá ser transferido para células hospedeiras apropriadas, seguido de cultura das células nas condições adequadas. A geração de vetores de expressão recombinantes, e os elementos neles incluídos, são bem conhecidos na técnica e são aqui brevemente discutidos. Em alternativa, a proteína que se pretende produzir poderá ser uma proteína endógena normalmente sintetizada pela célula, que é isolada e purificada.

Outra concretização do presente invento utiliza linhas celulares de linfócitos B autólogos, que são transfetadas com um vetor viral que expressa um produto imunogénico e, mais especificamente, uma proteína que possui atividade imunogénica. Outros exemplos de linhas celulares de hospedeiros mamíferos incluem, mas não exclusivamente, as células Vero e HeLa, outras linhas de células B e T, como CEM, 721.221, H9, Jurkat e Raji, assim como as linhas celulares de

células de ovário de hamster chinês, W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN e MDCK. Adicionalmente, poderá selecionar-se uma estirpe de célula hospedeira que module a expressão das sequências inseridas ou que modifique e processe o produto génico da forma desejada. Semelhantes modificações (por exemplo, glicosilação) e processamento (por exemplo, clivagem) dos produtos proteicos poderão ser importantes para a função da proteína. Diferentes células hospedeiras possuem mecanismos característicos e específicos para efetuar o processamento e a modificação pós-traducionais das proteínas. É possível escolher linhas celulares ou sistemas hospedeiros apropriados para garantir a correta modificação e processamento da proteína externa expressa.

É possível utilizar vários sistemas de seleção incluindo, embora não exclusivamente, os genes da timidina-cinase, hipoxantina/guanina-fosforribosiltransferase e adenina-fosforribosiltransferase do VHS, em células tk-, hgprt- ou aprt-, respetivamente. A resistência a antimetabolitos também pode ser usada como base de seleção: para dhfr, que confere resistência a trimetoprim e metotrexato; gpt, que confere resistência ao ácido micofenólico; neo, que confere resistência ao aminoglicósido G418; e hygro, que confere resistência à higromicina.

As células animais podem ser propagadas *in vitro* de duas formas: como células não dependentes de ancoragem, crescendo em suspensão por todo o volume da cultura, ou como células dependentes de ancoragem, que necessitam da ligação a um substrato sólido para a sua propagação (isto é, um tipo de crescimento celular em monocamada).

As culturas em suspensão, ou não dependentes de ancoragem, de linhas celulares estabelecidas (contínuas) constituem o meio usado mais amplamente para a produção em grande escala de células e produtos celulares. Contudo, as células crescidas em suspensão têm limitações, tais como potencial tumorigénico e uma menor produção de proteínas do que as células aderentes.

Quando uma proteína é aqui especificamente mencionada, a referência é preferencialmente a uma proteína nativa ou recombinante ou, opcionalmente, a uma proteína em que qualquer

sequência de sinal foi removida. A proteína poderá ser isolada diretamente a partir da estirpe de estafilococos ou produzida por técnicas de ADN recombinante. Os fragmentos imunogénicos da proteína poderão ser incorporados na composição imunogénica do invento. Estes são fragmentos que compreendem pelo menos 10 aminoácidos, 20 aminoácidos, 30 aminoácidos, 40 aminoácidos, 50 aminoácidos ou 100 aminoácidos, incluindo todos os valores e intervalos intermédios, retirados contiguamente da sequência de aminoácidos da proteína. Além disso, tais fragmentos imunogénicos são imunologicamente reativos com anticorpos gerados contra as proteínas estafilocócicas ou com anticorpos gerados através da infeção de um hospedeiro mamífero com estafilococos. Os fragmentos imunogénicos também incluem fragmentos que, quando são administrados numa dose eficaz (seja sozinhos ou como um hapteno preso a um transportador), desencadeiam uma resposta imune protetora ou terapêutica contra a infeção estafilocócica; em determinados aspetos, a resposta é protetora contra a infeção por *S. aureus* e/ou *S. epidermidis*. Este fragmento imunogénico poderá incluir, por exemplo, a proteína desprovida de uma sequência *leader* N-terminal e/ou um domínio transmembranar e/ou um domínio de ancoragem C-terminal. Num aspeto preferido, o fragmento imunogénico de acordo com o invento compreende praticamente todo o domínio extracelular de uma proteína que possui uma identidade de pelo menos 80%, uma identidade de pelo menos 85%, uma identidade de pelo menos 90%, uma identidade de pelo menos 95% ou uma identidade de pelo menos 97-99%, incluindo todos os valores e intervalos intermédios, com um segmento de sequência selecionada de um polipéptido aqui descrito ou referenciado.

Igualmente incluídas nas composições imunogénicas do invento estão as proteínas de fusão constituídas por uma ou mais proteínas de estafilococos ou fragmentos imunogénicos de proteínas de estafilococos. Tais proteínas de fusão poderão ser produzidas recombinantemente e poderão compreender uma porção de pelo menos 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 proteínas ou segmentos estafilocócicos. Em alternativa, uma proteína de fusão poderá compreender várias porções de pelo menos 1, 2, 3, 4 ou 5 proteínas de estafilococos. Estas poderão combinar diferentes proteínas de estafilococos e/ou múltiplos da mesma proteína ou fragmento proteico, ou fragmentos imunogénicos na mesma

proteína (formando um multímero ou um concatâmero). Em alternativa, o invento também inclui proteínas de fusão individuais de proteínas de estafilococos ou seus fragmentos imunogénicos, como uma proteína de fusão com sequência heteróloga, por exemplo, sequências que fornecem epitopos de células T ou marcas de purificação como: β -galactosidase, glutationa-S-transferase, proteínas verdes fluorescentes (GFP), marcas epitópicas como FLAG, myc, tag e poli-histidina, proteínas de superfície virais como a hemaglutinina do vírus da gripe, ou proteínas bacterianas como a anatoxina tetânica, a anatoxina diftérica ou CRM197.

IV. Ácidos nucleicos

Em determinadas concretizações, o presente invento refere-se a polinucleótidos recombinantes que codificam as proteínas, polipéptidos e péptidos do invento. As sequências de ácido nucleico para a SpA, as coagulases e outras proteínas bacterianas estão incluídas e podem ser usadas para preparar péptidos ou polipéptidos.

Tal como utilizado neste pedido, o termo "polinucleótido" refere-se a uma molécula de ácido nucleico que é recombinante ou foi isolada do ácido nucleico genómico total. Incluídos no termo "polinucleótido" estão os oligonucleótidos (ácidos nucleicos com 100 resíduos ou menos de comprimento), os vetores recombinantes, incluindo, por exemplo, plasmídeos, cosmídeos, fagos e vírus, e similares. Em certos aspetos, os polinucleótidos incluem sequências reguladoras, essencialmente isoladas dos seus genes ou sequências codificantes de proteínas naturais. Os polinucleótidos poderão ser de cadeia simples (codificante ou antissenso) ou de cadeia dupla e poderão ser ARN, ADN (genómico, ADNc ou sintético), análogos destes ou uma sua combinação. Embora não seja necessário, poderão estar presentes sequências codificantes ou não codificantes adicionais num polipéptido.

Neste sentido, o termo "gene", "polinucleótido" ou "ácido nucleico" é utilizado para designar um ácido nucleico que codifica uma proteína, polipéptido ou péptido (incluindo quaisquer sequências necessárias para uma correta transcrição, modificação pós-traducional ou localização). Como os peritos

na especialidade compreenderão, este termo engloba as sequências genómicas, as cassetes de expressão, as sequências de ADNc e os segmentos de ácidos nucleicos manipulados mais pequenos que expressam, ou poderão ser adaptados para expressar, proteínas, polipéptidos, domínios, péptidos, proteínas de fusão e mutantes. Um ácido nucleico que codifica a totalidade ou parte de um polipéptido poderá conter uma sequência de ácido nucleico contígua de: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 441, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000, 1010, 1020, 1030, 1040, 1050, 1060, 1070, 1080, 1090, 1095, 1100, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 9000, 10000 ou mais nucleótidos, nucleósidos ou pares de bases, incluindo todos os valores e intervalos intermédios, de um polinucleótido que codifica uma ou mais sequências de aminoácidos aqui descritas ou referenciadas. Está igualmente contemplado que um polipéptido particular possa ser codificado por ácidos nucleicos contendo variações com sequências nucleotídicas ligeiramente diferentes, mas que em todo o caso codificam a mesma proteína ou uma proteína praticamente similar (ver a Tabela 2 acima).

Em concretizações particulares, o invento refere-se a segmentos de ácido nucleico isolados e vetores recombinantes incorporando sequências de ácido nucleico que codificam a SpA variante. O termo "recombinante" poderá ser utilizado em conjunção com um polinucleótido ou polipéptido e geralmente refere-se a um polipéptido ou polinucleótido produzido e/ou manipulado *in vitro* ou que é um produto da replicação de semelhante molécula.

Noutras concretizações, o invento refere-se a segmentos de ácido nucleico isolados e vetores recombinantes incorporando sequências de ácido nucleico que codificam o polipéptido ou péptido variante da SpA para gerar uma resposta

imune num sujeito. Em várias concretizações, os ácidos nucleicos do invento poderão ser usados em vacinas genéticas.

Os segmentos de ácido nucleico utilizados no presente invento podem ser combinados com outras sequências de ácido nucleico, tais como promotores, sinais de poliadenilação, sítios de enzimas de restrição adicionais, locais múltiplos de clonagem, outros segmentos codificantes e similares, de modo que o seu comprimento global pode variar consideravelmente. Está, pois, contemplada a possibilidade de utilizar um fragmento de ácido nucleico praticamente de qualquer comprimento, em que o comprimento total é de preferência limitado pela facilidade de preparação e utilização no protocolo de ácidos nucleicos recombinantes pretendido. Em alguns casos, uma sequência de ácido nucleico poderá codificar uma sequência polipeptídica com sequências codificantes heterólogas adicionais, por exemplo para permitir a purificação do polipéptido, o transporte, a secreção ou a modificação pós-traducional, ou benefícios terapêuticos como direcionamento ou eficácia. Tal como discutido acima, é possível adicionar uma marca ou outro polipéptido heterólogo à sequência que codifica o polipéptido modificado, em que "heterólogo" refere-se a um polipéptido que não é o mesmo que o polipéptido modificado.

Em determinadas concretizações diferentes, o invento refere-se a segmentos de ácido nucleico isolados e vetores recombinantes que incluem na sua sequência uma sequência de ácido nucleico contígua proveniente da SEQ ID NO:1 (domínio D da SpA) ou SEQ ID NO:3 (SpA), ou quaisquer outras sequências de ácido nucleico que codificam coagulases ou outros fatores de virulência segregados e/ou proteínas de superfície, incluindo proteínas transportadas pela via Ess, processadas pela sortase, ou proteínas.

Em certas concretizações, o presente invento proporciona variantes polinucleotídicas que possuem uma identidade substancial com as sequências aqui divulgadas; aquelas possuindo uma identidade de sequência de pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou superior, incluindo todos os valores e intervalos intermédios, comparadas com uma sequência polinucleotídica deste invento utilizando os métodos

aqui descritos (por exemplo, a análise BLAST com parâmetros padrão).

O invento também contempla a utilização de polinucleótidos que são complementares de todos os polinucleótidos descritos acima.

E. Vetores

Os polipéptidos do invento poderão ser codificados por uma molécula de ácido nucleico contida num vetor. O termo "vetor" é utilizado para designar uma molécula de ácido nucleico transportadora na qual é possível inserir uma sequência de ácido nucleico heteróloga, para introdução numa célula onde pode ser replicada e expressa. Uma sequência de ácido nucleico pode ser "heteróloga", o que significa que está num contexto estranho à célula em que o vetor é introduzido ou ao ácido nucleico no qual é incorporada, que inclui uma sequência homóloga de uma sequência na célula ou no ácido nucleico, mas numa posição na célula hospedeira ou no ácido nucleico na qual não é normalmente encontrada. Os vetores incluem ADN, ARN, plasmídeos, cosmídeos, vírus (bacteriófagos, vírus animais e vírus de plantas) e cromossomas artificiais (por exemplo, YAC). Um perito na especialidade estaria perfeitamente equipado para construir um vetor utilizando técnicas recombinantes padrão (por exemplo, Sambrook *et al.*, 2001; Ausubel *et al.*, 1996, ambos aqui incorporados através de referência). Além de codificar uma polipéptido variante da SpA, o vetor pode codificar outras sequências polipeptídicas, tais como um ou mais péptidos bacterianos, uma marca ou um péptido para reforço da imunogenicidade. Os vetores úteis que codificam estas proteínas de fusão incluem os vetores pIN (Inouye *et al.*, 1985), os vetores que codificam um trecho de histidinas, e os vetores pGEX para utilizar na produção de proteínas de fusão solúveis com glutathione-S-transferase, para posterior purificação e separação ou clivagem.

O termo "vetor de expressão" refere-se a um vetor contendo uma sequência de ácido nucleico que codifica pelo menos parte de um produto génico capaz de ser transcrito. Em alguns casos, as moléculas de ARN são depois traduzidas numa proteína, polipéptido ou péptido. Os vetores de expressão podem conter

uma variedade de "sequências de controlo", que são as sequências de ácido nucleico necessárias para a transcrição e, possivelmente, a tradução, num organismo hospedeiro particular, de uma sequência codificante ligada funcionalmente. Além das sequências de controlo que regulam a transcrição e a tradução, os vetores e vetores de expressão poderão conter sequências de ácido nucleico que desempenham igualmente outras funções e que estão aqui descritas.

1. Promotores e amplificadores

Um "promotor" é uma sequência de controlo. O promotor é tipicamente uma região de uma sequência de ácido nucleico na qual a iniciação e a velocidade da transcrição são controladas. O promotor poderá conter elementos genéticos aos quais proteínas e moléculas reguladoras, como a ARN-polimerase e outros fatores de transcrição, se poderão ligar. As frases "posicionado funcionalmente", "ligado funcionalmente", "sob controlo" e "sob controlo transcricional" significam que um promotor está numa localização e/ou orientação funcional correta em relação a uma sequência de ácido nucleico, para controlar a iniciação da transcrição e a expressão dessa sequência. Um promotor poderá ou não ser usado em conjunção com um "amplificador", que designa uma sequência reguladora em cis envolvida na ativação transcricional de uma sequência de ácido nucleico.

Naturalmente, poderá ser importante utilizar um promotor e/ou amplificador que dirija efetivamente a expressão do segmento de ADN no tipo de célula ou organismo selecionado para a expressão. Os peritos na especialidade de biologia molecular estão geralmente familiarizados com a utilização de promotores, amplificadores e combinações de tipos celulares para a expressão de proteínas (ver Sambrook *et al.*, 2001). Os promotores empregues poderão ser constitutivos, específicos de um tecido ou indutíveis e, em determinadas concretizações, poderão dirigir um nível elevado de expressão do segmento de ADN introduzido sob condições específicas, como seja a produção em grande escala de proteínas ou péptidos recombinantes.

Vários elementos/promotores poderão ser empregues no contexto do presente invento para regular a expressão de um gene.

Não se crê que o promotor particular utilizado para controlar a expressão do polinucleótido que codifica o péptido ou proteína do invento seja crítico, desde que seja capaz de expressar o polinucleótido numa célula-alvo, preferencialmente uma célula bacteriana. Quando se visa uma célula humana, é preferível posicionar a região codificante do polinucleótido adjacente e sob o controlo de um promotor que pode ser expresso numa célula humana. Em termos gerais, este promotor poderá incluir um promotor bacteriano, humano ou viral.

Em concretizações em que a expressão da proteína é obtida mediante a administração de um vetor a um sujeito, um promotor desejável para utilizar com o vetor consiste num promotor que não é regulado negativamente por citocinas ou num promotor suficientemente forte para, mesmo que regulado negativamente, produzir uma quantidade eficaz de uma SpA variante para desencadear uma resposta imune. Exemplos não limitativos destes promotores são o promotor de IE de CMV e o promotor de LTR de RSV. É possível utilizar promotores específicos de um tecido, particularmente se a expressão tiver lugar em células nas quais é desejável que ocorra a expressão de um antigénio, como sejam as células dendríticas ou os macrófagos. Os promotores do MHC I e MHC II de mamífero são exemplos destes promotores específicos de um tecido.

2. Sinais de iniciação e sítios internos de entrada do ribossoma (IRES)

Um sinal de iniciação específico também poderá ser necessário para a tradução eficiente das sequências codificantes. Estes sinais incluem o codão de iniciação ATG ou sequências adjacentes. Poderá ser necessário fornecer sinais de controlo traducional exógenos, incluindo o codão de iniciação ATG. Um perito na especialidade seria capaz de determinar isto facilmente e providenciar os sinais necessários.

Em determinadas concretizações do invento, a utilização de elementos do tipo sítios internos de entrada do ribossoma (IRES do inglês *internal ribosome entry sites*) cria mensagens multigênicas ou policistrônicas. Os elementos IRES são capazes de contornar o modelo de varrimento da tradução, dependente da estrutura Cap metilada na extremidade 5', e iniciar a tradução em sítios internos (Pelletier and Sonenberg, 1988; Macejak and Sarnow, 1991). Os elementos IRES podem ser ligados a grelhas de leitura abertas heterólogas. É possível efetuar a transcrição conjunta de múltiplas grelhas de leitura abertas, cada uma delas separada por um IRES, criando mensagens policistrônicas. É possível expressar eficazmente múltiplos genes, utilizando um único promotor/amplificador para transcrever uma única mensagem (ver Patentes U.S. 5,925,565 e 5,935,819).

3. Marcadores visuais e de seleção

Em determinadas concretizações do invento, as células contendo uma construção de ácido nucleico do presente invento poderão ser identificadas, *in vitro* ou *in vivo*, codificando um marcador visual ou de seleção no vetor de expressão. Quando é transcrito e traduzido, um marcador confere uma alteração identificável à célula, permitindo uma identificação fácil das células que contêm o vetor de expressão.

F. Células hospedeiras

Tal como aqui utilizados, os termos "célula", "linha celular" e "cultura celular" poderão ser usados indistintamente. Todos estes termos também incluem a respectiva descendência, que consiste em todas e quaisquer gerações subsequentes. Está subentendido que toda a descendência poderá não ser idêntica devido a mutações deliberadas ou involuntárias. No contexto da expressão de uma sequência de ácido nucleico heteróloga, o termo "célula hospedeira" refere-se a uma célula procariótica ou eucariótica e inclui qualquer organismo transformável capaz de replicar um vetor ou expressar um gene heterólogo codificado por um vetor. Uma célula hospedeira pode ser, e tem sido, utilizada como recetor para vetores ou vírus. Uma célula hospedeira poderá ser "transfetada" ou "transformada", termos que designam um

processo pelo qual um ácido nucleico exógeno, como seja uma sequência que codifica uma proteína recombinante, é transferido ou introduzido na célula hospedeira. Uma célula transformada inclui a célula primária e a sua descendência.

As células hospedeiras poderão ser derivadas de procariotas ou eucariotas, incluindo bactérias, células de levedura, células de inseto e células de mamífero, para a replicação do vetor ou a expressão da totalidade ou parte da(s) sequência(s) de ácido nucleico. Estão disponíveis numerosas linhas e culturas celulares que podem ser usadas como célula hospedeira, e estas podem ser obtidas através da American Type Culture Collection (ATCC), que é uma organização que atua como arquivo para culturas vivas e materiais genéticos (www.atcc.org).

G. Sistemas de expressão

Existem numerosos sistemas de expressão que compreendem pelo menos uma parte ou a totalidade das composições discutidas acima. É possível utilizar sistemas à base de procariotas e/ou eucariotas com o presente invento para produzir sequências de ácido nucleico ou os seus polipéptidos, proteínas e péptidos cognatos. Muitos destes sistemas estão comercial e amplamente disponíveis.

O sistema de baculovírus/células de inseto pode produzir um nível elevado de expressão proteica de um segmento de ácido nucleico heterólogo, conforme descrito nas Patentes U.S. 5,871,986 e 4,879,236, e pode ser adquirido, por exemplo, sob a designação MAXBAC® 2.0 através de INVITROGEN® e como SISTEMA DE EXPRESSÃO DE BACULOVÍRUS BACPACK™ através de CLONTECH®.

Além dos sistemas de expressão divulgados do invento, outros exemplos de sistemas de expressão incluem o sistema de expressão indutível em mamíferos COMPLETE CONTROL™ de STRATAGENE®, que envolve um recetor sintético indutível por ecdisona, ou o seu sistema de expressão pET, um sistema de expressão em *E. coli*. Outro exemplo de um sistema de expressão indutível está disponível através de INVITROGEN® e transporta o sistema T-REX™ (expressão regulada pela tetraciclina), um sistema de expressão indutível em mamíferos que utiliza o

promotor CMV completo. A INVITROGEN® também disponibiliza um sistema de expressão em levedura denominado sistema de expressão em *Pichia methanolica*, que foi concebido para a produção de alto rendimento de proteínas recombinantes na levedura metilotrófica *Pichia methanolica*. Um perito na especialidade saberia como expressar um vetor, por exemplo, uma construção de expressão, para produzir uma sequência de ácido nucleico ou o seu polipéptido, proteína ou péptido cognato.

V. POLISSACARÍDEOS

As composições imunogénicas do invento poderão compreender adicionalmente polissacarídeos capsulares, incluindo um ou mais de entre o polissacarídeo PIA (também conhecido como PNAG) e/ou um polissacarídeo capsular de tipo V e/ou tipo VIII de *S. aureus* e/ou um polissacarídeo capsular de tipo I e/ou tipo II e/ou tipo III de *S. epidermidis*.

H. PIA (PNAG)

Hoje é evidente que as várias formas dos polissacarídeos de superfície de estafilococos identificadas como PS/A, PIA e SAA são a mesma entidade química - PNAG (Maira-Litran *et al.*, 2004). Por conseguinte, o termo PIA ou PNAG engloba todos estes polissacarídeos ou os oligossacarídeos derivados deles.

O PIA é uma adesina polissacarídea intercelular e é constituído por um polímero de glucosamina com ligações β -(1-6) substituída com constituintes N-acetilo e O-succinilo. Este polissacarídeo está presente tanto em *S. aureus* como em *S. epidermidis* e pode ser isolado a partir de qualquer uma das fontes (Joyce *et al.*, 2003; Maira-Litran *et al.*, 2002). Por exemplo, o PNAG poderá ser isolado a partir da estirpe MN8m de *S. aureus* (W004/43407). O PIA isolado de *S. epidermidis* é um constituinte integral do biofilme. Ele é responsável por mediar a adesão célula-célula e provavelmente também atua para proteger a colónia em crescimento da resposta imune do hospedeiro. Recentemente, foi demonstrado que o polissacarídeo previamente conhecido como poli-N-succinil- β -(1-6)-glucosamina (PNSG) não possui a estrutura esperada, uma vez que a identificação da N-succinilação estava incorreta (Maira-

Litran *et al.*, 2002). Assim, o polissacarídeo formalmente conhecido como PNSG e agora identificado como PNAG também está englobado pelo termo PIA.

O PIA (ou PNAG) poderá ter diferentes tamanhos, variando desde mais de 400 kDa até 75 a 400 kDa, e entre 10 e 75 kDa para os oligossacarídeos constituídos por um máximo de 30 unidades de repetição (de glucosamina com ligações β -(1-6) substituída com constituintes N-acetilo e O-succinilo). É possível utilizar um polissacarídeo ou oligossacarídeo PIA de qualquer tamanho numa composição imunogénica do invento. Num aspeto, o polissacarídeo tem mais de 40 kDa. O dimensionamento poderá ser obtido por qualquer método conhecido na técnica, por exemplo, por microfluidificação, irradiação ultrassónica ou clivagem química (WO 03/53462, EP497524, EP497525). Em determinados aspetos, o PIA (PNAG) tem pelo menos ou não mais de 40-400 kDa, 40-300 kDa, 50-350 kDa, 60-300 kDa, 50-250 kDa e 60-200 kDa.

O PIA (PNAG) pode ter um grau diferente de acetilação devido à substituição nos grupos amino por acetato. O PIA produzido *in vitro* está quase totalmente substituído nos grupos amino (95-100%). Em alternativa, é possível usar um PIA (PNAG) desacetilado possuindo menos de 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% de acetilação. A utilização de um PIA (PNAG) desacetilado é preferida, uma vez que os epitopos não acetilados do PNAG são eficazes na mediação da morte opsónica de bactérias Gram-positivas, de preferência *S. aureus* e/ou *S. epidermidis*. Em certos aspetos, o PIA (PNAG) tem um tamanho compreendido entre 40 kDa e 300 kDa e é desacetilado, de modo que menos de 60%, 50%, 40%, 30% ou 20% dos grupos amino estão acetilados.

O termo PNAG desacetilado (dPNAG) refere-se a um polissacarídeo ou oligossacarídeo PNAG em que menos de 60%, 50%, 40%, 30%, 20% ou 10% dos grupos amino estão acetilados. Em determinados aspetos, o PNAG é desacetilado para formar dPNAG por meio de tratamento químico do polissacarídeo nativo. Por exemplo, o PNAG nativo é tratado com uma solução básica, de forma a subir o pH para um valor acima de 10. Por exemplo, o PNAG é tratado com NaOH, KOH ou NH₄OH 0,1-5 M, 0,2-4 M, 0,3-3 M, 0,5-2 M, 0,75-1,5 M ou 1 M. O tratamento é efetuado durante pelo menos 10 a 30 minutos, ou 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15

ou 20 horas a uma temperatura de 20-100, 25-80, 30-60 ou 30-50 ou 35-45 °C. O dPNAG poderá ser preparado da forma descrita em WO 04/43405.

O(s) polissacarídeo(s) podem ser conjugados ou não conjugados com uma proteína transportadora.

I. Polissacarídeos de tipo 5 e tipo 8 de *S. aureus*

A maioria das estirpes de *S. aureus* que causam infeção no homem contém polissacarídeos de tipo 5 ou de tipo 8. Aproximadamente 60% das estirpes humanas são de tipo 8 e aproximadamente 30% são de tipo 5. As estruturas dos antigénios polissacarídeos capsulares de tipo 5 e tipo 8 estão descritas em *Moreau et al.*, (1990) e em *Fournier et al.*, (1984). Ambos possuem FucNAcp na sua unidade de repetição, assim como ManNACA que pode ser usado para introduzir um grupo sulfidriilo. As estruturas são:

Tipo 5

→4)-β-D-ManNACA(30Ac) - (1→4) -α-L-FucNAc(1→3) -β-D-FucNAc- (1→

Tipo 8

→3)-β-D-ManNACA(40Ac) - (1→3) -α-L-FucNAc(1→3) -β-D-FucNAc- (1→

Recentemente (Jones, 2005), a espectroscopia de RMN permitiu a revisão das estruturas para:

Tipo 5

→4)-β-D-ManNACA- (1→4) -α-L-FucNAc(30Ac) - (1→3) -β-D-FucNAc- (1→

Tipo 8

→3)-β-D-ManNACA(40Ac) - (1→3) -α-L-FucNAc(1→3) -α-D-FucNAc(1→

Os polissacarídeos poderão ser extraídos da estirpe apropriada de *S. aureus* utilizando métodos bem conhecidos pelos peritos na especialidade. Ver Patente U.S. 6,294,177. Por

exemplo, ATCC 12902 é uma estirpe de *S. aureus* de tipo 5 e ATCC 12605 é uma estirpe de *S. aureus* de tipo 8.

Os polissacarídeos têm o tamanho nativo ou, em alternativa, poderão ser dimensionados, por exemplo, por microfluidificação, irradiação ultrassónica ou tratamento químico. O invento também abrange os oligossacarídeos derivados dos polissacarídeos de tipo 5 e 8 de *S. aureus*. Os polissacarídeos de tipo 5 e 8 incluídos na composição imunogénica do invento estão preferencialmente conjugados com uma proteína transportadora como descrito abaixo ou, em alternativa, não estão conjugados. Em alternativa, as composições imunogénicas do invento contêm um polissacarídeo ou de tipo 5 ou de tipo 8.

J. Antígeno 336 de *S. aureus*

Numa concretização, a composição imunogénica do invento compreende o antígeno 336 de *S. aureus* descrito na Patente U.S. 6,294,177. O antígeno 336 compreende hexosamina com ligações β , não contém grupos O-acetilo e liga-se especificamente a anticorpos contra *S. aureus* tipo 336, depositado sob ATCC 55804. Numa concretização, o antígeno 336 é um polissacarídeo de tamanho nativo ou, em alternativa, poderá ser dimensionado, por exemplo, por microfluidificação, irradiação ultrassónica ou tratamento químico. O invento também abrange os oligossacarídeos derivados do antígeno 336. O antígeno 336 pode estar conjugado ou não conjugado com uma proteína transportadora.

K. Polissacarídeos de tipo I, II e III de *S. epidermidis*

Entre os problemas associados à utilização de polissacarídeos em vacinação encontra-se o facto de os polissacarídeos, *per se*, serem imunogénios fracos. É preferido que os polissacarídeos utilizados no invento estejam ligados a uma proteína transportadora que recruta a ajuda de células T espetadoras, de modo a melhorar a imunogenicidade. Os exemplos destes transportadores que poderão ser conjugados com imunogénios polissacarídeos incluem as anatoxinas diftérica e tetânica (DT, DT CRM197 e TT respetivamente), a hemocianina de lapa californiana (KLH) e o derivado proteico purificado de

tuberculina (PPD), a exoproteína A de *Pseudomonas aeruginosa* (rEPA), a proteína D de *Haemophilus influenzae*, a pneumolisina ou fragmentos de qualquer uma das proteínas acima. Os fragmentos adequados para utilização incluem os fragmentos que englobam epitopos das células T auxiliares. Em particular, o fragmento da proteína D de *H. influenza* conterá preferencialmente o 1/3 N-terminal da proteína. A proteína D é uma proteína de ligação a IgD de *Haemophilus influenzae* (EP 0 594 610 B1) e é um potencial imunogénio. Além disso, as proteínas de estafilococos poderão ser usadas como uma proteína transportadora nos conjugados polissacarídeos do invento.

Uma proteína transportadora cuja utilização seria particularmente vantajosa no contexto de uma vacina de estafilococos é a anatoxina alfa estafilocócica. Uma vez que o processo de conjugação reduz a toxicidade, a forma nativa pode ser conjugada com um polissacarídeo. De preferência, utilizam-se toxinas alfa geneticamente destoxificadas, como as variantes His35Leu ou His35Arg, como transportadores, dado que a toxicidade residual é mais baixa. Em alternativa, a toxina alfa é destoxificada quimicamente por tratamento com um agente de reticulação, formaldeído ou glutaraldeído. Uma toxina alfa geneticamente destoxificada é opcionalmente destoxificada quimicamente, preferencialmente por tratamento com um agente de reticulação, formaldeído ou glutaraldeído, para reduzir adicionalmente a toxicidade.

Os polissacarídeos poderão ser ligados à(s) proteína(s) transportadora(s) por qualquer método conhecido (por exemplo, aqueles métodos descritos nas Patentes U.S. 4,372,945, 4,474,757 e 4,356,170). Preferencialmente, realiza-se a química de conjugação CDAP (ver WO95/08348). Em CDAP, o reagente de cianilação tetrafluoroborato de 1-ciano-dimetilaminopiridínio (CDAP) é preferencialmente usado para a síntese de conjugados polissacarídeo-proteína. A reação de cianilação pode ser efetuada em condições relativamente brandas, o que evita a hidrólise dos polissacarídeos sensíveis a bases. Esta síntese permite o acoplamento direto a uma proteína transportadora.

A conjugação envolve preferencialmente a produção de uma ligação direta entre a proteína transportadora e o

polissacarídeo. Opcionalmente, poderá introduzir-se um espaçador (como di-hidreto adípico (ADH)) entre a proteína transportadora e o polissacarídeo.

IV. Resposta imune e ensaios

Tal como discutido acima, o invento está relacionado com a provocação ou a indução num sujeito de uma resposta imune contra uma SpA variante ou um péptido de coagulase. Numa concretização, a resposta imune pode proteger contra, ou tratar um sujeito que tem, é suspeito de ter ou está em risco de desenvolver, uma infeção ou uma doença relacionada, particularmente aquelas relacionadas com estafilococos. Uma utilização das composições imunogénicas do invento consiste na prevenção de infeções nosocomiais, através da inoculação de um sujeito antes de ser submetido a um procedimento num hospital ou noutro ambiente que apresenta um risco acrescido de infeção.

A. Imunoensaios

A presente divulgação inclui a implementação de ensaios serológicos para avaliar se, e em que extensão, as composições do invento induzem ou provocam uma resposta imune. Há muitos tipos de imunoensaios que podem ser implementados. Os imunoensaios abrangidos pela presente divulgação incluem, mas não estão limitados, aqueles descritos na Patente U.S. 4,367,110 (ensaio sanduiche com anticorpos monoclonais) e na Patente U.S. 4,452,901 (transferência de western). Outros ensaios incluem a imunoprecipitação de ligandos marcados e a imunocitoquímica, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Os imunoensaios são geralmente ensaios de ligação. Alguns imunoensaios preferidos são os vários tipos de ensaios imunossorventes ligados a enzima (ELISA do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*) e os radioimunoensaios (RIA) conhecidos na técnica. A deteção imuno-histoquímica utilizando secções de tecidos também é particularmente útil. Num exemplo, os anticorpos ou antigénios são imobilizados numa superfície selecionada, como seja um poço numa microplaca de titulação de polistireno, uma vareta ou o enchimento de uma coluna. Em seguida, uma composição de teste suspeita de conter o antigénio ou anticorpo desejado, por exemplo uma amostra clínica, é

adicionada aos poços. Após ligação e lavagem para remover os complexos imunes que não estão especificamente ligados, poderá detetar-se o antigénio ou anticorpo ligado. A deteção é geralmente obtida através da adição de outro anticorpo, específico para o antigénio ou anticorpo desejado, que está unido a um marcador detetável. Este tipo de ELISA é conhecido como um "ELISA sanduiche". A deteção também poderá ser obtida por meio da adição de um segundo anticorpo específico para o antigénio desejado, seguida da adição de um terceiro anticorpo que tem afinidade de ligação para o segundo anticorpo, em que o terceiro anticorpo está unido a um marcador detetável.

Os ensaios ELISA de competição também são implementações possíveis em que as amostras de teste competem pela ligação a quantidades conhecidas de antigénios ou anticorpos marcados. A quantidade de espécie reativa na amostra desconhecida é determinada por mistura da amostra com a espécie marcada conhecida, antes ou durante a incubação com os poços revestidos. A presença da espécie reativa na amostra atua para reduzir a quantidade de espécie marcada que está disponível para efetuar a ligação ao poço, reduzindo assim o sinal final. Independentemente do formato utilizado, os ensaios ELISA têm certas características em comum, como o revestimento, a incubação ou ligação, a lavagem para remover as espécies que não estão especificamente ligadas e a deteção dos complexos imunes ligados.

Os antigénios ou anticorpos também poderão ser ligados a um suporte sólido, por exemplo sob a forma de uma placa, esferas, uma vareta, uma membrana ou a matriz de uma coluna, sendo a amostra que se pretende analisar aplicada ao anticorpo ou antigénio imobilizado. Ao revestir uma placa com um antigénio ou anticorpo, geralmente incubar-se-ão os poços da placa com uma solução do antigénio ou anticorpo, durante a noite ou durante um período de tempo especificado. Os poços da placa serão depois lavados para remover o material incompletamente adsorvido. Quaisquer superfícies dos poços que ainda estejam disponíveis são depois "cobertas" com uma proteína não específica, que é antigenicamente neutra em relação aos antissoros de teste. Estas incluem a albumina sérica de bovino (BSA), a caseína e soluções de leite em pó. O revestimento permite o bloqueio dos sítios de adsorção não

específicos na superfície de imobilização, reduzindo o sinal de fundo causado pela ligação não específica dos anticorpos à superfície.

O termo "anticorpos", tal como aqui utilizado, inclui os anticorpos monoclonais, policlonais, quiméricos, de cadeia única, biespecíficos, simianizados, humanizados ou primatizados, assim como os fragmentos Fab, como aqueles fragmentos que conservam a especificidade de ligação dos anticorpos, incluindo os produtos de uma biblioteca de expressão de imunoglobulinas Fab. Por conseguinte, o invento contempla a utilização de cadeias únicas, tais como as cadeias leves e pesadas variáveis dos anticorpos. A produção de qualquer um destes tipos de anticorpos ou fragmentos de anticorpos é bem conhecida pelos peritos na especialidade. Exemplos específicos de produção de um anticorpo dirigido para uma proteína bacteriana podem ser encontrados na Publicação do Pedido de Patente U.S. n.º 20030153022.

Qualquer um dos polipéptidos, proteínas, péptidos e/ou anticorpos descritos acima poderá ser marcado diretamente com um marcador detetável para a identificação e quantificação de bactérias do tipo estafilococos. Os marcadores para utilizar nos imunoensaios são geralmente conhecidos pelos peritos na especialidade e incluem enzimas, radioisótopos e substâncias fluorescentes, luminescentes e cromogénicas, incluindo partículas coloridas como ouro coloidal ou esferas de látex. Os imunoensaios adequados incluem os ensaios imunossorventes ligados a enzima (ELISA).

C. Imunidade protetora

Em algumas concretizações do invento, as composições proteínáceas conferem imunidade protetora a um sujeito. A imunidade protetora refere-se à capacidade de um corpo para montar uma resposta imune específica que protege o sujeito contra o desenvolvimento de uma doença ou afeção particular, que envolve o agente contra o qual existe uma resposta imune. Uma quantidade imunogenicamente eficaz é capaz de conferir imunidade protetora ao sujeito.

Tal como aqui utilizado no fascículo e na secção de reivindicações que se segue, o termo polipéptido ou péptido refere-se a um trecho de aminoácidos ligados covalentemente entre si via ligações peptídicas. Diferentes polipéptidos possuem diferentes funcionalidades de acordo com o presente invento. Enquanto, de acordo com um aspeto, um polipéptido é derivado de um imunogénio concebido para induzir uma resposta imune ativa num destinatário, de acordo com outro aspeto do invento, um polipéptido é derivado de um anticorpo que é produzido no seguimento da provocação de uma resposta imune ativa, por exemplo, num animal e que pode servir para induzir uma resposta imune passiva no destinatário. Em ambos os casos, contudo, o polipéptido é codificado por um polinucleótido em conformidade com qualquer utilização permitida dos codões.

Tal como aqui utilizada, a frase "resposta imune" ou o seu equivalente "resposta imunológica" refere-se ao desenvolvimento de uma resposta humoral (mediada por anticorpos), celular (mediada por células T específicas para um antigénio ou pelos seus produtos de secreção) ou tanto humoral como celular dirigida contra uma proteína, péptido, carboidrato ou polipéptido do invento num doente recetor. Esta resposta pode ser uma resposta ativa induzida pela administração de um imunogénio ou uma resposta passiva induzida pela administração de um anticorpo, um material contendo anticorpos ou células T sensibilizadas. Uma resposta imune celular é desencadeada pela apresentação de epitopos polipeptídicos em associação com moléculas do MHC de classe I ou classe II, para ativar células T auxiliares CD4 (+) e/ou células T citotóxicas CD8 (+) específicas para um antigénio. A resposta também poderá envolver a ativação de monócitos, macrófagos, células NK, basófilos, células dendríticas, astrócitos, células microgliais, eosinófilos ou outros componentes da imunidade inata. Tal como aqui utilizado, o termo "imunidade ativa" refere-se a qualquer imunidade conferida a um sujeito pela administração de um antigénio.

Tal como aqui utilizado, o termo "imunidade passiva" refere-se a qualquer imunidade conferida a um sujeito sem a administração de um antigénio ao sujeito. Assim, a "imunidade passiva" inclui, embora não esteja limitada a ela, a administração de efetores imunes ativados, incluindo

mediadores celulares ou mediadores proteicos (por exemplo, anticorpos monoclonais e/ou policlonais) de uma resposta imune. Uma composição de anticorpos monoclonais ou policlonais poderá ser usada em imunização passiva, para a prevenção ou o tratamento de uma infecção em organismos que transportam o antigénio reconhecido pelo anticorpo. Uma composição de anticorpos poderá incluir anticorpos que se ligam a uma variedade de antigénios que poderão, por sua vez, estar associados a vários organismos. O componente contendo anticorpos pode ser um antissoro policlonal. Em determinados aspetos, o(s) anticorpo(s) é/são purificado(s) por afinidade a partir de um animal ou de um segundo sujeito que foi provocado com um antigénio(s). Em alternativa, poderá utilizar-se uma mistura de anticorpos, que é uma mistura de anticorpos monoclonais e/ou policlonais para antigénios presentes nos mesmos micróbios ou organismos, em micróbios ou organismos relacionados ou em micróbios ou organismos diferentes, tais como bactérias gram-positivas e bactérias gram-negativas, incluindo, mas não exclusivamente, bactérias do tipo estafilococos.

A imunidade passiva poderá ser conferida a um doente ou sujeito através da administração ao doente de imunoglobulinas (Ig) e/ou outros fatores imunes, obtidos de um dador ou de outra fonte que não o doente com uma imunorreatividade conhecida. Noutros aspetos, uma composição antigénica do presente invento pode ser administrada a um sujeito, que atuará depois como fonte ou dador da globulina produzida em resposta à provocação com a composição antigénica ("globulina hiperimune") e que contém anticorpos dirigidos contra estafilococos ou outro organismo. Um sujeito tratado desta forma doaria plasma, a partir do qual a globulina hiperimune seria depois obtida (via metodologia convencional de fracionamento do plasma) e administrada a outro sujeito, de modo a conferir-lhe resistência contra a infecção por estafilococos ou para tratar a infecção por estafilococos. As globulinas hiperimunes de acordo com o invento são particularmente úteis para indivíduos imunocomprometidos, indivíduos submetidos a procedimentos invasivos ou quando não há tempo para que o indivíduo produza os seus próprios anticorpos em resposta à vacinação. Consultar as Patentes U.S. 6,936,258; 6,770,278; 6,756,361; 5,548,066; 5,512,282;

4,338,298 e 4,748,018 para ver métodos e composições exemplificativos relacionados com a imunidade passiva.

Para efeitos deste fascículo e das reivindicações anexas, os termos "epitopo" e "determinante antigénico" são utilizados indistintamente para designar um sítio num antigénio ao qual as células B e/ou T respondem ou reconhecem. Os epitopos das células B podem ser formados tanto a partir de aminoácidos contíguos como de aminoácidos não contíguos justapostos pelo enrolamento terciário de uma proteína. Os epitopos formados a partir de aminoácidos contíguos são tipicamente conservados com a exposição a solventes desnaturantes, ao passo que os epitopos formados pelo enrolamento terciário são normalmente perdidos com o tratamento com solventes desnaturantes. Um epitopo inclui tipicamente pelo menos 3, mais habitualmente pelo menos 5 ou 8-10 aminoácidos, numa conformação espacial única. Os métodos de determinação da conformação espacial dos epitopos incluem, por exemplo, a cristalografia de raios x e a ressonância magnética nuclear bidimensional. Ver, por exemplo, Epitope Mapping Protocols (1996). Os anticorpos que reconhecem o mesmo epitopo podem ser identificados num imunoensaio simples que ilustre a capacidade de um anticorpo para bloquear a ligação de outro anticorpo a um antigénio-alvo. As células T reconhecem epitopos contínuos de cerca de nove aminoácidos para as células CD8 ou de cerca de 13-15 aminoácidos para as células CD4. As células T que reconhecem o epitopo podem ser identificadas por meio de ensaios *in vitro* que medem a proliferação dependente de antigénio, conforme determinada pela incorporação de ³H-timidina por células T sensibilizadas em resposta a um epitopo (Burke *et al.*, 1994), por morte dependente de antigénio (ensaio de linfócitos T citotóxicos; Tigges *et al.*, 1996) ou por secreção de citocinas.

A presença de uma resposta imunológica mediada por células pode ser determinada por meio de ensaios de proliferação (células T CD4 (+)) ou de ensaios CTL (linfócitos T citotóxicos). As contribuições relativas das respostas humoral e celular para o efeito protetor ou terapêutico de um imunogénio podem ser diferenciadas através de isolamento em separado das células T e das IgG a partir de um animal singénico imunizado, seguido de medição do efeito protetor ou terapêutico num segundo sujeito.

Tal como aqui e nas reivindicações utilizados, os termos "anticorpo" ou "imunoglobulina" são utilizados indistintamente e referem-se a qualquer uma de várias classes de proteínas estruturalmente relacionadas que fazem parte da resposta imune de um animal ou recetor, em que estas proteínas incluem IgG, IgD, IgE, IgA, IgM e proteínas relacionadas.

Em condições fisiológicas normais, os anticorpos são encontrados no plasma, noutros fluidos corporais e na membrana de determinadas células e são produzidos por linfócitos do tipo denominado células B ou um seu equivalente funcional. Os anticorpos da classe IgG são constituídos por quatro cadeias polipeptídicas unidas por ligações dissulfureto. As quatro cadeias das moléculas IgG intactas consistem em duas cadeias pesadas idênticas designadas por cadeias H e duas cadeias leves idênticas designadas por cadeias L.

De modo a produzir anticorpos policlonais, um hospedeiro, como um coelho ou uma cabra, é imunizado com o antigénio ou um fragmento do antigénio, geralmente com um adjuvante e, se necessário, acoplado a um transportador. Os anticorpos para o antigénio são subsequentemente recolhidos a partir do soro do hospedeiro. O anticorpo policlonal pode ser purificado por afinidade contra o antigénio, tornando-o monoespecífico.

Os anticorpos monoclonais podem ser produzidos por hiperimunização de um dador apropriado com o antigénio ou *ex vivo* mediante a utilização de culturas primárias de células esplénicas ou de linhas celulares derivadas do baço (Anavi, 1998; Huston *et al.*, 1991; Johnson *et al.*, 1991; Mernaugh *et al.*, 1995).

Tal como aqui e nas reivindicações utilizada, a frase "uma porção imunológica de um anticorpo" inclui um fragmento Fab de um anticorpo, um fragmento Fv de um anticorpo, uma cadeia pesada de um anticorpo, uma cadeia leve de um anticorpo, um heterodímero consistindo numa cadeia pesada e numa cadeia leve de um anticorpo, um fragmento variável de uma cadeia leve de um anticorpo, um fragmento variável de uma cadeia pesada de um anticorpo e uma variante de cadeia única de um anticorpo, que é também conhecida como scFv. Além disso, o termo inclui

imunoglobulinas quiméricas, que são os produtos de expressão de genes fundidos derivados de diferentes espécies; uma das espécies pode ser um ser humano, dizendo-se neste caso que uma imunoglobulina quimérica é humanizada. Tipicamente, uma porção imunológica de um anticorpo compete com o anticorpo intacto do qual foi derivada pela ligação específica a um antigénio.

Opcionalmente, um anticorpo, ou de preferência uma porção imunológica de um anticorpo, pode ser quimicamente conjugado com, ou expresso como, uma proteína de fusão com outras proteínas. Para efeitos deste fascículo e das reivindicações anexas, todas essas proteínas fundidas estão incluídas na definição de anticorpos ou de uma porção imunológica de um anticorpo.

Tal como aqui utilizados, os termos "agente imunogénico" ou "imunogénio" ou "antigénio" são utilizados indistintamente para descrever uma molécula capaz de induzir uma resposta imunológica contra si própria ao ser administrada a um recetor, quer sozinha, em conjugação com um adjuvante ou apresentada num veículo de apresentação.

D. Métodos de tratamento

Um polipéptido imunogénico do invento pode ser administrado para induzir uma resposta imune numa pessoa infetada com estafilococos ou suspeita de ter sido exposta a estafilococos. Poderão empregar-se métodos relativamente a indivíduos que testaram positivo quanto à exposição a estafilococos ou que são considerados em risco de infeção com base numa possível exposição.

Em particular, o invento engloba composições para utilizar num método de tratamento da infeção por estafilococos, em particular infeções nosocomiais adquiridas em hospital. As composições imunogénicas e as vacinas do invento são particularmente vantajosas para utilizar em casos de cirurgia eletiva. Esses doentes saberão a data da cirurgia com antecedência e podem ser inoculados com antecedência. As composições imunogénicas e as vacinas do invento também são vantajosas para utilizar na inoculação dos profissionais de saúde.

Em algumas concretizações, o tratamento é administrado na presença de adjuvantes ou transportadores ou outros antigénios de estafilococos. Além disso, em alguns exemplos, o tratamento compreende a administração de outros agentes normalmente usados no combate à infeção bacteriana, como um ou mais antibióticos.

A utilização de péptidos para vacinação pode exigir, embora não necessariamente, a conjugação do péptido com uma proteína transportadora imunogénica, como seja o antigénio de superfície da hepatite B, a hemocianina de lapa californiana ou a albumina sérica de bovino. Os métodos para efetuar esta conjugação são bem conhecidos na técnica.

VI. Vacina e outras composições farmacêuticas e administração

E. Vacinas

O presente invento inclui métodos para prevenir ou melhorar as infeções por estafilococos, em particular as infeções nosocomiais adquiridas em hospital. Como tal, o invento contempla vacinas para utilizar em concretizações de imunização tanto ativa como passiva. As composições imunogénicas, consideradas adequadas para utilização como uma vacina, poderão ser preparadas a partir de polipéptido(s) da SpA imunogénico(s), tal como uma variante do domínio D da SpA, ou de coagulases imunogénicas. Noutras concretizações, a SpA ou as coagulases podem ser usadas em combinação com outras proteínas de virulência segregadas, proteínas de superfície ou seus fragmentos imunogénicos. Em determinados aspetos, o material antigénico é extensivamente dialisado para remover moléculas de pequeno peso molecular indesejadas e/ou liofilizado para permitir uma formulação mais fácil num veículo desejado.

Outras opções para uma vacina à base de proteína/péptido envolvem a introdução de ácidos nucleicos que codificam o(s) antigénio(s) como vacinas de ADN. Quanto a isto, comunicações recentes descreveram a construção de vírus da vacina recombinantes expressando quer 10 epitopos mínimos contíguos

dos CTL (Thomson, 1996) quer uma combinação de epitopos de células B, linfócitos T citotóxicos (CTL) e células T auxiliares (Th) provenientes de vários micróbios (An, 1997), e a utilização com êxito destas construções para imunizar ratinhos e sensibilizar respostas imunes protetoras. Assim, existem amplas provas na literatura da utilização com êxito de péptidos, células apresentadoras de antígenos (APC do inglês *antigen presenting cell*) pulsadas com péptidos e construções que codificam péptidos para a sensibilização eficaz *in vivo* de respostas imunes protetoras. A utilização de sequências de ácido nucleico como vacinas está exemplificada nas Patentes U.S. 5,958,895 e 5,620,896.

A preparação de vacinas que contêm sequência(s) polipeptídica(s) ou peptídica(s) como ingredientes ativos é, de um modo geral, bem compreendida na técnica, como exemplificado pelas Patentes U.S. 4,608,251; 4,601,903; 4,599,231; 4,599,230; 4,596,792 e 4,578,770. Tipicamente, tais vacinas são preparadas como injetáveis, quer como soluções quer como suspensões líquidas; também poderão preparar-se formas sólidas adequadas para solução ou suspensão num líquido antes da injeção. A preparação poderá ser igualmente emulsionada. O ingrediente imunogénico ativo é frequentemente misturado com excipientes que são farmacologicamente aceitáveis e compatíveis com o ingrediente ativo. Os excipientes apropriados são, por exemplo, água, soro fisiológico, dextrose, glicerol, etanol, excipientes similares e combinações deles. Além disso, se desejado, a vacina poderá conter quantidades de substâncias auxiliares como agentes molhantes ou emulsionantes, agentes de tamponamento do pH ou adjuvantes que reforçam a eficácia das vacinas. Em concretizações específicas, as vacinas são formuladas com uma combinação de substâncias, conforme descrito nas Patentes U.S. 6,793,923 e 6,733,754.

As vacinas poderão ser administradas parentericamente, por injeção, por exemplo, subcutânea ou intramuscularmente. As formulações adicionais que são adequadas para outros modos de administração incluem os supositórios e, nalguns casos, as formulações orais. No caso dos supositórios, os ligantes e veículos tradicionais poderão incluir, por exemplo, polialquilenoglicóis ou triglicéridos; estes supositórios

poderão ser preparados a partir de misturas contendo o ingrediente ativo no intervalo de cerca de 0,5% a cerca de 10%, de preferência cerca de 1% a cerca de 2%. As formulações orais incluem excipientes normalmente utilizados como, por exemplo, graus farmacêuticos de manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina de sódio, celulose, carbonato de magnésio e similares. Estas composições adotam a forma de soluções, suspensões, comprimidos, pílulas, cápsulas, formulações de libertação prolongada ou pós e contêm cerca de 10% a cerca de 95% de ingrediente ativo, de preferência cerca de 25% a cerca de 70%.

Os polipéptidos e as construções de ADN que codificam polipéptidos poderão ser formulados numa vacina como formas neutras ou como sais. Os sais farmacêuticamente aceitáveis incluem os sais de adição de ácido (formados com os grupos amino livres do péptido) e aqueles que são formados com ácidos inorgânicos como, por exemplo, os ácidos clorídrico ou fosfórico, ou com ácidos orgânicos como os ácidos acético, oxálico, tartárico, mandélico e similares.

Tipicamente, as vacinas são administradas de uma maneira compatível com a forma farmacêutica e numa quantidade que será terapeuticamente eficaz e imunogénica. A quantidade a administrar depende do sujeito em tratamento, incluindo a capacidade do sistema imune do indivíduo para sintetizar anticorpos e o grau de proteção desejado. As quantidades precisas do ingrediente ativo que é necessário administrar dependem da avaliação do profissional. Contudo, os intervalos de dose adequados são da ordem de várias centenas de microgramas de ingrediente ativo por vacinação. Os regimes posológicos adequados para a administração inicial e os reforços também são variáveis, embora sejam tipificados por uma administração inicial seguida de inoculações subsequentes ou outras administrações.

O modo de aplicação poderá ter grandes variações. Qualquer um dos métodos convencionais para administração de uma vacina pode ser aplicado. Estes incluem a aplicação oral numa base sólida fisiologicamente aceitável ou numa dispersão fisiologicamente aceitável, parentericamente, por injeção e

similares. A dose da vacina dependerá da via de administração e variará de acordo com o tamanho e a saúde do sujeito.

Em certos casos, será desejável ter múltiplas administrações da vacina, por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6 ou mais administrações. **As vacinações podem ter lugar a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 a 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 intervalos de doze semanas,** incluindo todos os intervalos intermédios. Os reforços periódicos a intervalos de 1-5 anos serão desejáveis para manter níveis protetores dos anticorpos. O ciclo da imunização poderá ser seguido por ensaios para os anticorpos dirigidos contra os antigénios, como descrito nas Patentes U.S. 3,791,932; 4,174,384 e 3,949,064.

1. Transportadores

Uma dada composição pode variar na sua imunogenicidade. Por conseguinte, muitas vezes é necessário reforçar o sistema imune do hospedeiro, podendo alcançar-se isso através do acoplamento de um péptido ou polipéptido a um transportador. Os transportadores exemplificativos e preferidos são a hemocianina de lapa californiana (KLH) e a albumina sérica de bovino (BSA). Outras albuminas, como a ovalbumina, a albumina sérica de ratinho ou a albumina sérica de coelho, também podem ser usadas como transportadores. Os meios para conjugar um polipéptido com uma proteína transportadora são bem conhecidos na técnica e incluem o glutaraldeído, o éster do ácido m-maleimidobenzóico e da N-hidroxisuccinimida, a carbodiimida e a benzidina bis-biazotada.

2. Adjuvantes

A imunogenicidade das composições de polipéptidos ou péptidos pode ser aumentada mediante a utilização de estimulantes não específicos da resposta imune, conhecidos como adjuvantes. Os adjuvantes adequados incluem todos os compostos imunoestimulantes aceitáveis, como citocinas, toxinas ou composições sintéticas. É possível usar vários adjuvantes para aumentar uma resposta de anticorpos contra um polipéptido variante da SpA ou uma coagulase, ou qualquer outra proteína bacteriana ou combinação aqui contemplada. Os adjuvantes podem (1) aprisionar o antigénio no corpo para

originar uma libertação lenta; (2) atrair as células envolvidas na resposta imune para o local de administração; (3) induzir a proliferação ou ativação das células do sistema imunitário ou (4) melhorar a disseminação do antigénio pelo corpo do sujeito.

Os adjuvantes incluem, mas não estão limitados a, emulsões óleo em água, emulsões água em óleo, sais minerais, polinucleótidos e substâncias naturais. Os adjuvantes específicos que poderão ser usados incluem IL-1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, interferão- γ , GMCSP, BCG, sais de alumínio como hidróxido de alumínio ou outro composto de alumínio, compostos de MDP como thur-MDP e nor-MDP, CGP (MTP-PE), lípido A e lípido A monofosforilo (MPL). O sistema adjuvante RIBI, que contém três componentes extraídos de bactérias, MPL, dimicolato de trealose (TDM) e esqueleto da parede celular (CWS), numa emulsão contendo 2% de escaleno e Tween 80. Poderão mesmo ser usados antigénios do MHC. Outros adjuvantes e métodos estão exemplificados nas Patentes U.S. 6,814,971; 5,084,269 e 6,656,462.

Os vários métodos de obtenção do efeito adjuvante para a vacina incluem a utilização de agentes como hidróxido ou fosfato de alumínio, normalmente usados como uma solução a entre cerca de 0,05% e cerca de 0,1% em tampão fosfato salino, a mistura com polímeros sintéticos de açúcares (Carbopol®) utilizados como uma solução a cerca de 0,25% e a agregação da proteína na vacina por tratamento térmico com temperaturas entre cerca de 70 °C e cerca de 101 °C, durante um período de 30 segundos a 2 minutos, respetivamente. A agregação mediante reativação com anticorpos tratados com pepsina (Fab) dirigidos para a albumina, a mistura com células bacterianas (por exemplo, *C. parvum*), endotoxinas ou componentes lipopolissacarídeos de bactérias Gram-negativas, a emulsão em veículos oleosos fisiologicamente aceitáveis (por exemplo, monooleato de manido (Aracel A)) ou a emulsão com uma solução a 20% de um perfluorocarboneto (Fluosol-DA®) usado como substituto de bloqueio também poderão ser empregues para produzir um efeito adjuvante.

Os exemplos de adjuvantes que são frequentemente preferidos incluem o adjuvante completo de Freund (um

estimulante não específico da resposta imune contendo *Mycobacterium tuberculosis* morta), os adjuvantes incompletos de Freund e o hidróxido de alumínio.

Em alguns aspetos, é preferido que o adjuvante seja selecionado para ser um indutor preferencial de uma resposta do tipo Th1 ou do tipo Th2. Níveis elevados de citocinas do tipo Th1 tendem a favorecer a indução de respostas imunes mediadas por células a um dado antigénio, ao passo que níveis elevados de citocinas do tipo Th2 tendem a favorecer a indução de respostas imunes humorais ao antigénio.

A distinção entre resposta imune do tipo Th1 e do tipo Th2 não é absoluta. Na realidade, um indivíduo suportará uma resposta imune que é descrita como sendo predominantemente Th1 ou predominantemente Th2. Contudo, muitas vezes é conveniente considerar as famílias de citocinas em termos daquilo descrito nos clones de células T CD4+ murinas por Mosmann e Coffman (Mosmann, and Coffman, 1989). Tradicionalmente, as respostas do tipo Th1 estão associadas à produção das citocinas INF- γ e IL-2 por linfócitos T. Outras citocinas muitas vezes diretamente associadas à indução de respostas imunes do tipo Th1 não são produzidas por células T, como IL-12. Em contraste, as respostas do tipo Th2 estão associadas à secreção de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10.

Além dos adjuvantes, poderá ser desejável coadministrar modificadores da resposta biológica (BRM do inglês *biologic response modifiers*) para aumentar as respostas imunes. Tem sido revelado que os BRM regulam positivamente a imunidade pelas células T ou regulam negativamente a atividade das células supressoras. Tais BRM incluem, mas não estão limitados a, cimetidina (CIM; 1200 mg/d) (Smith/Kline, PA); ciclofosfamida em dose reduzida (CYP; 300 mg/m²) (Johnson/Mead, NJ), citocinas como o interferão- γ , IL-2 ou IL-12 ou genes que codificam proteínas envolvidas em funções imunes auxiliares, como B-7.

F. Frações e componentes lipídicos

Em determinadas concretizações, o presente invento refere-se a composições compreendendo um ou mais lípidos

associados a um ácido nucleico ou um polipéptido/péptido. Um lípido é uma substância que é insolúvel em água e extraível com um solvente orgânico. Os peritos na especialidade reconhecem compostos diferentes daqueles aqui especificamente descritos como lípidos, e estes estão abrangidos pelas composições e métodos do presente invento. Um componente lipídico e um componente que não é um lípido podem ser unidos um ao outro de forma covalente ou não covalente.

Um lípido poderá ser um lípido naturalmente existente ou um lípido sintético. Contudo, um lípido é geralmente uma substância biológica. Os lípidos biológicos são bem conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, gorduras neutras, fosfolípidos, fosfoglicéridos, esteroides, terpenos, lisolípidos, glicosfingolípidos, glucolípidos, sulfatidos, lípidos com éter e ácidos gordos ligados a éster, lípidos polimerizáveis e suas combinações.

Uma molécula de ácido nucleico ou um polipéptido/péptido, associado a um lípido, poderá ser disperso numa solução contendo um lípido, dissolvido com um lípido, emulsionado com um lípido, misturado com um lípido, combinado com um lípido, ligado covalentemente a um lípido, contido num lípido como uma suspensão ou associado de uma outra forma a um lípido. Uma composição lipídica ou lipídica associada a um poxvírus do presente invento não está limitada a nenhuma estrutura particular. Por exemplo, as composições poderão estar simplesmente disseminadas numa solução, eventualmente formando agregados que não são uniformes nem em tamanho nem em forma. Noutro exemplo, as composições poderão estar presentes numa estrutura em bicamada, como micelas, ou com uma estrutura "colapsada". Noutro exemplo não limitativo, está também contemplado um complexo lipofectamina (Gibco BRL)-poxvírus ou Superfect (Qiagen)-poxvírus.

Em certas concretizações, uma composição poderá compreender cerca de 1%, cerca de 2%, cerca de 3%, cerca de 4% cerca de 5%, cerca de 6%, cerca de 7%, cerca de 8%, cerca de 9%, cerca de 10%, cerca de 11%, cerca de 12%, cerca de 13%, cerca de 14%, cerca de 15%, cerca de 16%, cerca de 17%, cerca de 18%, cerca de 19%, cerca de 20%, cerca de 21%, cerca de 22%, cerca de 23%, cerca de 24%, cerca de 25%, cerca de 26%,

cerca de 27%, cerca de 28%, cerca de 29%, cerca de 30%, cerca de 31%, cerca de 32%, cerca de 33%, cerca de 34%, cerca de 35%, cerca de 36%, cerca de 37%, cerca de 38%, cerca de 39%, cerca de 40%, cerca de 41%, cerca de 42%, cerca de 43%, cerca de 44%, cerca de 45%, cerca de 46%, cerca de 47%, cerca de 48%, cerca de 49%, cerca de 50%, cerca de 51%, cerca de 52%, cerca de 53%, cerca de 54%, cerca de 55%, cerca de 56%, cerca de 57%, cerca de 58%, cerca de 59%, cerca de 60%, cerca de 61%, cerca de 62%, cerca de 63%, cerca de 64%, cerca de 65%, cerca de 66%, cerca de 67%, cerca de 68%, cerca de 69%, cerca de 70%, cerca de 71%, cerca de 72%, cerca de 73%, cerca de 74%, cerca de 75%, cerca de 76%, cerca de 77%, cerca de 78%, cerca de 79%, cerca de 80%, cerca de 81%, cerca de 82%, cerca de 83%, cerca de 84%, cerca de 85%, cerca de 86%, cerca de 87%, cerca de 88%, cerca de 89%, cerca de 90%, cerca de 91%, cerca de 92%, cerca de 93%, cerca de 94%, cerca de 95%, cerca de 96%, cerca de 97%, cerca de 98%, cerca de 99%, ou qualquer intervalo intermédio, de um lípido particular, um tipo de lípido ou um componente não lipídico como seja um adjuvante, um antigénio, um péptido, um polipéptido, um açúcar, um ácido nucleico ou outro material aqui divulgado ou tal como conhecido por um perito na especialidade. Num exemplo não limitativo, uma composição poderá compreender cerca de 10% a cerca de 20% de lípidos neutros, cerca de 33% a cerca de 34% de um cerebrosido e cerca de 1% de colesterol. Noutro exemplo não limitativo, um lipossoma poderá compreender cerca de 4% a cerca de 12% de terpenos, em que cerca de 1% da micela é especificamente constituída por licopeno, deixando cerca de 3% a cerca de 11% do lipossoma constituído por outros terpenos; cerca de 10% a cerca de 35% de fosfatidilcolina e cerca de 1% de um componente não lipídico. Assim, está contemplado que as composições do presente invento possam compreender quaisquer uns dos lípidos, tipos de lípidos ou outros componentes em qualquer combinação ou intervalo percentual.

G. Terapêutica de combinação

As composições e métodos relacionados do presente invento, particularmente a administração de um fator de virulência segregado ou de uma proteína de superfície, incluindo um polipéptido ou péptido variante da SpA, e/ou outras proteínas ou péptidos bacterianos a um doente/sujeito,

também poderão ser usados em combinação com a administração de terapêuticas tradicionais. Estas incluem, embora não exclusivamente, a administração de antibióticos como estreptomicina, ciprofloxacina, doxiciclina, gentamicina, cloranfenicol, trimetoprim, sulfametoxazol, ampicilina, tetraciclina ou várias combinações de antibióticos.

Num aspeto, está contemplado que uma vacina e/ou terapêutica à base de um polipéptido seja usada em conjunção com o tratamento antibacteriano. Em alternativa, a terapêutica poderá anteceder ou suceder ao tratamento com o outro agente em intervalos que vão desde minutos a semanas. Em concretizações em que os outros agentes e/ou as proteínas ou polinucleótidos são administrados separadamente, normalmente assegurar-se-á que não decorre um período de tempo significativo entre o momento de cada administração, de modo que o agente e a composição antigénica ainda sejam capazes de exercer um efeito combinado vantajoso no sujeito. Nesses casos, está contemplada a possibilidade de administrar ambas as modalidades com uma diferença de cerca de 12-24 h uma da outra ou uma diferença de cerca de 6-12 h uma da outra. Nalgumas situações, poderá ser desejável prolongar significativamente o período de tempo para a administração, decorrendo vários dias (2, 3, 4, 5, 6 ou 7) a várias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8) entre as respetivas administrações.

É possível recorrer a várias combinações, por exemplo, a terapêutica com antibiótico é "A" e a molécula imunogénica administrada como parte de um regime terapêutico imune, tal como um antigénio, é "B":

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

A administração das composições imunogénicas do presente invento a um doente/sujeito seguirá os protocolos gerais para a administração de tais compostos, tendo em atenção a toxicidade, caso exista, da composição da SpA ou de outras

composições aqui descritas. Espera-se que os ciclos de tratamento sejam repetidos conforme necessário. Está igualmente contemplada a possibilidade de aplicar várias terapêuticas convencionais, como a hidratação, em combinação com a terapêutica descrita.

H. Composições farmacêuticas gerais

Em algumas concretizações, são administradas composições farmacêuticas a um sujeito. Diferentes aspetos do presente invento envolvem a administração de uma quantidade eficaz de uma composição a um sujeito. Em algumas concretizações da presente divulgação, antigénios de estafilococos, membros da via Ess, incluindo polipéptidos ou péptidos da classe Esa ou Esx, e/ou membros dos substratos da sortase poderão ser administrados ao doente para protegê-lo contra a infeção por um ou mais agentes patogénicos do tipo estafilococos. Em alternativa, um vetor de expressão que codifica um ou mais destes polipéptidos ou péptidos poderá ser administrado a um doente como tratamento preventivo. Adicionalmente, tais compostos podem ser administrados em combinação com um antibiótico ou um antibacteriano. Estas composições estarão geralmente dissolvidas ou dispersas num veículo ou meio aquoso farmacêuticamente aceitável.

Além dos compostos formulados para administração parentérica, como aqueles para injeção intravenosa ou intramuscular, outras formas farmacêuticamente aceitáveis incluem, por exemplo, comprimidos ou outros sólidos para administração oral, cápsulas de libertação controlada e qualquer outra forma atualmente usada, incluindo cremes, loções, elixires bucais, formas para inalação e similares.

Os compostos ativos do presente invento podem ser formulados para administração parentérica, por exemplo, formulados para injeção pela via intravenosa, intramuscular, subcutânea ou mesmo intraperitoneal. A preparação de uma composição aquosa que contém um composto ou compostos que aumentam a expressão de uma molécula do MHC de classe I será conhecida pelos peritos na especialidade à luz da presente divulgação. Tipicamente, tais composições podem ser preparadas como injetáveis, quer como soluções quer como suspensões

líquidas; também é possível preparar formas sólidas adequadas para produzir soluções ou suspensões mediante a adição de um líquido antes da injeção; e as preparações podem ser igualmente emulsionadas.

É possível preparar soluções dos compostos ativos como bases livres ou sais farmacologicamente aceitáveis em água convenientemente misturada com um tensioativo, tal como hidroxipropilcelulose. Também é possível preparar dispersões em glicerol, polietilenoglicóis líquidos, suas misturas e óleos. Em condições normais de armazenamento e utilização, estas preparações contêm um conservante para impedir o crescimento de microrganismos.

As formas farmacêuticas adequadas para uso injetável incluem soluções ou dispersões aquosas estéreis, formulações incluindo óleo de sésamo, óleo de amendoim ou propilenoglicol aquoso e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou dispersões injetáveis estéreis. Em todos os casos, a forma tem que ser estéril e suficientemente fluida para poder ser facilmente injetada. Também deverá ser estável nas condições de fabrico e armazenamento e tem que estar protegida da ação contaminante de microrganismos, tais como bactérias e fungos.

As composições proteínáceas poderão ser formuladas como formas neutras ou como sais. Os sais farmacêuticamente aceitáveis incluem os sais de adição de ácido (formados com os grupos amino livres da proteína), que são formados com ácidos inorgânicos como, por exemplo, os ácidos clorídrico ou fosfórico, ou com ácidos orgânicos como os ácidos acético, oxálico, tartárico, mandélico e similares. Os sais formados com os grupos carboxilo livres também podem ser produzidos a partir de bases inorgânicas como, por exemplo, os hidróxidos de sódio, potássio, amónio, cálcio ou férrico e bases orgânicas como a isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína e similares.

O veículo também pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, um poliol (por exemplo, glicerol, propilenoglicol, polietilenoglicol líquido e similares), misturas adequadas destes e óleos vegetais. A

fluidez adequada pode ser preservada, por exemplo, mediante a utilização de um revestimento como a lecitina, mediante a manutenção do tamanho de partícula necessário no caso de uma dispersão e mediante o uso de tensioativos. A prevenção da ação dos microrganismos pode ser obtida através de vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal e similares. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares ou cloreto de sódio. A absorção prolongada das composições injetáveis pode ser obtida mediante a utilização, nas composições, de agentes que atrasam a absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio e gelatina.

As soluções injetáveis estéreis são preparadas por incorporação dos compostos ativos, na quantidade necessária, no solvente apropriado, juntamente com vários dos outros componentes enumerados acima, conforme necessário, seguida de esterilização por filtração. De uma forma geral, as dispersões são preparadas por incorporação dos vários componentes ativos esterilizados num veículo estéril, que contém o meio de dispersão básico e os outros componentes necessários de entre aqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos preferidos de preparação são as técnicas de secagem sob vácuo e liofilização, que fornecem um pó do componente ativo mais qualquer componente desejado adicional, a partir de uma solução previamente filtrada em condições estéreis.

A administração das composições de acordo com o presente invento será tipicamente efetuada por qualquer via habitual. Tal inclui, mas não está limitado a, administração oral, nasal ou bucal. Em alternativa, a administração poderá ser feita por injeção ortotópica, intradérmica, subcutânea, intramuscular, intraperitoneal, intranasal ou intravenosa. Em determinadas concretizações, uma composição de vacina poderá ser inalada (por exemplo, Patente U.S. 6,651,655, que é especificamente incorporada através de referência). Tais composições seriam normalmente administradas como composições farmacologicamente aceitáveis que incluem veículos, tampões ou outros excipientes fisiologicamente aceitáveis. Tal como aqui utilizado, o termo "farmacologicamente aceitável" refere-se àqueles compostos, materiais, composições e/ou formas farmacêuticas que, no

âmbito de uma apreciação médica sólida, são adequados para estar em contacto com os tecidos dos seres humanos e animais sem excessiva toxicidade, irritação, resposta alérgica ou outras complicações, proporcionalmente a uma relação risco/benefício razoável. O termo "veículo farmacêuticamente aceitável" designa um material, composição ou veículo farmacêuticamente aceitável, tal como uma carga, diluente, excipiente, solvente ou material encapsulante líquido ou sólido, envolvido no suporte ou transporte de um agente químico.

Para a administração parentérica numa solução aquosa, por exemplo, a solução deverá ser adequadamente tamponada, se necessário, e o diluente líquido deverá ser primeiro tornado isotónico com uma quantidade suficiente de soro fisiológico ou glucose. Estas soluções aquosas particulares são especialmente adequadas para administração intravenosa, intramuscular, subcutânea e intraperitoneal. A este respeito, os meios aquosos estéreis que podem ser utilizados serão conhecidos pelos peritos na especialidade à luz da presente divulgação. Por exemplo, uma dose poderia ser dissolvida em solução de NaCl isotónica e adicionada a fluido de hipodermóclise ou injetada no local de infusão proposto (ver, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 1990). Verificar-se-á necessariamente uma certa variação da dose dependendo da condição do sujeito. Em todo o caso, a pessoa responsável pela administração determinará a dose apropriada para o sujeito individual.

Uma quantidade eficaz da composição terapêutica ou profilática é determinada com base no objetivo pretendido. O termo "dose unitária" ou "monodose" refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas para utilizar num sujeito, em que cada unidade contém uma quantidade predeterminada da composição, calculada para produzir as respostas desejadas discutidas acima em associação com a sua administração, isto é, a via e o regime posológico apropriados. A quantidade a administrar, de acordo tanto com o número de tratamentos como com a dose unitária, depende da proteção desejada.

As quantidades precisas da composição também dependem da avaliação do profissional e são próprias de cada indivíduo. Os fatores que afetam a dose incluem o estado físico e clínico do

sujeito, a via de administração, o objetivo pretendido com o tratamento (alívio dos sintomas versus cura) e a potência, estabilidade e toxicidade da composição particular.

Após a formulação, as soluções serão administradas de um modo compatível com a forma farmacêutica e numa quantidade que é terapêutica ou profilaticamente eficaz. As formulações são facilmente administradas numa variedade de formas farmacêuticas, tais como o tipo de soluções injetáveis descritas acima.

I. Administração *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*

Tal como aqui utilizado, o termo administração *in vitro* refere-se a manipulações efetuadas em células removidas de um sujeito ou no exterior de um sujeito, incluindo, mas não limitadas a, células em cultura. O termo administração *ex vivo* refere-se a células que foram manipuladas *in vitro* e são subsequentemente administradas a um sujeito. O termo administração *in vivo* inclui todas as manipulações efetuadas no interior de um sujeito.

Em determinados aspetos do presente invento, as composições poderão ser administradas *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*. Em certas concretizações *in vitro*, linhas celulares de linfócitos B autólogos são incubadas com um vetor viral do presente invento durante 24 a 48 horas ou com uma SpA variante e/ou coagulase e/ou qualquer outra composição aqui descrita durante duas horas. As células transduzidas podem depois ser usadas para análise *in vitro* ou, em alternativa, para administração *ex vivo*. As Patentes U.S. 4,690,915 e 5,199,942 divulgam métodos para proceder à manipulação *ex vivo* de células mononucleares sanguíneas e células da medula óssea destinadas a aplicações terapêuticas.

VII. EXEMPLOS

Os exemplos seguintes são fornecidos a fim de ilustrar várias concretizações do invento e não se destinam a limitar o presente invento de nenhuma forma. Um perito na especialidade compreenderá facilmente que o presente invento está bem adaptado para executar os objetos e obter os fins e vantagens

mencionados, assim como aqueles objetos, fins e vantagens inerentes a eles. Os presentes exemplos, juntamente com os métodos aqui descritos, são presentemente representativos das concretizações preferidas, são exemplificativos e não pretendem ser limitações do âmbito do invento.

EXEMPLO 1

VARIANTES DA PROTEÍNA A NÃO TOXIGÉNICAS COMO VACINAS SUBUNITÁRIAS PARA PREVENIR AS INFEÇÕES POR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Um modelo animal para a infecção por *S. aureus*. Ratinhos BALB/c foram infetados por injeção intravenosa com 1×10^7 UFC do isolado clínico humano *S. aureus* Newman (Baba *et al.*, 2007). No espaço de 6 horas após a infecção, 99,999% dos estafilococos desapareceram da corrente sanguínea e foram distribuídos via a vasculatura. A disseminação estafilocócica para os tecidos periféricos verificou-se rapidamente, uma vez que a carga bacteriana no rim e noutros tecidos de órgãos periféricos atingiu 1×10^5 UFC g^{-1} nas primeiras três horas. A carga estafilocócica nos tecidos renais aumentou em 1,5 log UFC no espaço de vinte e quatro horas. Quarenta e oito horas após a infecção, os ratinhos desenvolveram abscessos disseminados em múltiplos órgãos, detetáveis por microscopia ótica do tecido renal finamente seccionado e corado com hematoxilina-eosina. O diâmetro do abscesso inicial foi de 524 μ M (\pm 65 μ M); as lesões foram inicialmente marcadas por um influxo de leucócitos polimorfonucleares (PMN) e não albergavam nenhuma organização discernível dos estafilococos, a maior parte dos quais parecia situar-se no interior dos PMN. No dia 5 da infecção, os abscessos aumentaram de tamanho e delimitavam uma população central de estafilococos, rodeada por uma camada de material eosinofílico amorfo e um anel grande de PMN. A histopatologia revelou a existência de necrose massiva dos PMN na proximidade do nidus estafilocócico, no centro das lesões, bem como de um manto de fagócitos saudáveis. Observou-se uma coroa de PMN necróticos na periferia dos abscessos, contígua ao material eosinofílico amorfo que separa o tecido renal saudável das lesões. Os abscessos eventualmente atingiram um diâmetro \geq 1524 μ M no dia 15 ou 36. Em intervalos de tempo posteriores, a carga estafilocócica aumentou para 10^4 - 10^6 UFC g^{-1} e os abscessos em crescimento migraram na direção da cápsula do órgão. As lesões

periféricas mostraram-se propensas à rutura, libertando assim material necrótico e estafilococos na cavidade peritoneal ou no espaço retroperitoneal. Estes eventos produziram bacteriemia, bem como uma onda secundária de abscessos, acabando por precipitar um resultado letal.

Para enumerar a carga estafilocócica no tecido renal, os animais foram mortos, os seus rins excisados e o homogenato do tecido espalhado em meio contendo ágar-ágar para a formação de colónias. No dia 5 da infeção, observou-se uma média de 1×10^6 UFC g^{-1} de tecido renal para *S. aureus* Newman. Para quantificar a formação de abscessos, os rins foram inspecionados visualmente e cada órgão individual recebeu uma classificação de um ou zero. A soma final foi dividida pelo número total de rins para calcular a percentagem de abscessos à superfície (Tabela 3). Adicionalmente, rins selecionados aleatoriamente foram fixados em formalina, incluídos, cortados em secções finas e corados com hematoxilina-eosina. Para cada rim, observaram-se quatro secções sagitais a intervalos de 200 μ M por microscopia. O número de lesões foi contado para cada secção, calculando-se a média para quantificar o número de abscessos nos rins. *S. aureus* Newman provocou $4,364 \pm 0,889$ abscessos por rim e observaram-se abscessos à superfície em 14 de 20 rins (70%) (Tabela 3).

Quando foi examinada por microscopia eletrónica de varrimento, a bactéria *S. aureus* Newman foi localizada em camadas estreitamente associadas no centro dos abscessos. Os estafilococos encontravam-se limitados por uma pseudocápsula amorfa que separava as bactérias do anel de leucócitos do abscesso. Não foram observadas células imunes nestes ninhos centrais de estafilococos. Contudo, observaram-se glóbulos vermelhos ocasionais entre as bactérias. As populações bacterianas no centro do abscesso, denominadas *comunidades do abscesso estafilocócico* (SAC do inglês *staphylococcal abscess communities*), surgiram homogéneas e revestidas por um material granular e eletronicamente denso. A cinética do aparecimento das lesões infecciosas e os atributos morfológicos dos abscessos formados por *S. aureus* Newman foram similares aos observados após a infeção de ratinhos com *S. aureus* USA300 (LAC), o clone de *S. aureus* resistente à meticilina da epidemia atual adquirida na comunidade (CA-MRSA) nos Estados Unidos (Diep *et al.*, 2006).

Tabela 3. Requisitos genéticos para a formação de abscessos por *S. aureus* Newman em ratinhos

Genótipo	Carga estafilocócica no tecido renal			Formação de abscessos no tecido renal		
	^a log ₁₀ UFC g ⁻¹ de tecido	^b Significância (valor P)	^c Redução (Log ₁₀ UFC g ⁻¹)	^d Abscessos à superfície (%)	^e Número de abscessos por rim	^f Significância (valor P)
Tipo selvagem	6,141 ± 0,192	-	-	70	4,364 ± 0,889	-
<i>ΔsrTA</i>	4,095 ± 0,347	6,7 × 10 ⁻⁶	2,046	0	0,000 ± 0,000	0,0216
<i>spa</i>	5,137 ± 0,374	0,0144	1,004	13	0,375 ± 0,374	0,0356

^aMédia da carga estafilocócica, calculada como log₁₀ UFC g⁻¹, em tecidos renais homogeneizados, 5 dias após a infecção em coortes de quinze ratinhos BALB/c por estirpe da provocação. O erro padrão da média (\pm EPM) está indicado.

^bA significância estatística foi calculada com o teste *t* de Student e os valores P foram registrados; os valores P <0,05 foram considerados significativos.

^cRedução da carga bacteriana calculada como log₁₀ UFC g⁻¹.

^dA formação de abscessos em tecidos renais, cinco dias após a infecção, foi medida por inspeção macroscópica (% positiva).

^eHistopatologia de secções finas, coradas com hematoxilina-eosina, dos rins provenientes de oito a dez animais; o número médio de abscessos por rim foi registrado, calculando-se novamente a média para obter a média final (\pm EPM).

^fA significância estatística foi calculada com o teste *t* de Student e os valores P foram registrados; os valores P <0,05 foram considerados significativos.

Os mutantes de *S. aureus* da proteína A (*spa*) são avirulentos e não conseguem formar abscessos. A sortase A é uma transpeptidase que imobiliza dezanove proteínas de superfície no envelope da estirpe *S. aureus* Newman (Mazmanian *et al.*, 1999; Mazmanian *et al.*, 2000). Trabalhos prévios identificaram a sortase A como um fator de virulência em múltiplos sistemas de modelos animais. Contudo, as contribuições desta enzima e das suas proteínas de superfície ancoradas para a formação ou persistência dos abscessos ainda não foram reveladas (Jonsson *et al.*, 2002; Weiss *et al.*, 2004). Em comparação com o progenitor de tipo selvagem (Baba *et al.*, 2007), uma variante *srtA* isogénica ($\Delta srtA$) não conseguiu formar abscessos perante um exame macroscópico ou histopatológico nos dias 2, 5 ou 15. Em ratinhos infetados com o mutante *strA*, recuperaram-se apenas 1×10^4 UFC g⁻¹ do tecido renal no dia 5 da infeção, que é uma redução de $2,046 \log_{10}$ UFC g⁻¹ em comparação com a estirpe parental de tipo selvagem ($P=6,73 \times 10^{-6}$). Observou-se um defeito idêntico para o mutante *srtA* da estirpe de MRSA USA300 (resultados não apresentados). A microscopia eletrónica de varrimento mostrou que os mutantes *srtA* estavam muito dispersos e frequentemente associados a leucócitos no tecido renal de outro modo saudável. No dia quinze após a infeção, os mutantes *srtA* foram eliminados dos tecidos renais, uma redução $\geq 3,5 \log_{10}$ UFC g⁻¹ em comparação com o tipo selvagem (Tabela 3). Assim, as proteínas de superfície ancoradas pela sortase A permitem a formação de abscessos e a persistência das bactérias nos tecidos do hospedeiro, onde os estafilococos se replicam como comunidades incluídas numa matriz extracelular e protegidas dos leucócitos circundantes por uma pseudocápsula amorfa.

A sortase A ancora um largo espectro de proteínas com sinais de endereçamento contendo um motivo LPXTG ao envelope da parede celular, permitindo desta forma a apresentação à superfície de muitos fatores de virulência (Mazmanian *et al.*, 2002). Para identificar as proteínas de superfície necessárias para a formação dos abscessos estafilocócicos, introduziram-se inserções *bursa aurealis* nas sequências codificantes 5' de genes que codificam polipéptidos com um motivo LPXTG (Bae *et al.*, 2004), e estas mutações foram transduzidas em *S. aureus* Newman. As mutações no gene estrutural para a proteína A (*spa*) reduziram a carga estafilocócica nos tecidos renais de ratinhos

infetados em $1,004 \log_{10}$ ($P=0,0144$). Quando foram analisados por histopatologia quanto à capacidade de formar abscessos nos tecidos renais, observámos que os mutantes *spa* não foram capazes de formar abscessos em comparação com a estirpe parental de tipo selvagem *S. aureus* Newman (*S. aureus* Newman de tipo selvagem $4,364 \pm 0,889$ abscessos por rim versus o mutante *spa* isogénico com $0,375 \pm 0,374$ lesões; $P = 0,0356$).

A proteína A bloqueia as respostas imunes inata e adaptável. Estudos identificaram a proteína A como sendo um fator de virulência crítico durante a patogénese das infeções por *S. aureus*. Trabalhos prévios demonstraram que a proteína A impede a fagocitose dos estafilococos através da ligação ao componente Fc da imunoglobulina (Jensen, 1958; Uhlen *et al.*, 1984), ativa a agregação plaquetária via o fator de von Willebrand (Hartleib *et al.*, 2000), atua como um superantígeno das células B ao capturar a região F(ab)₂ da IgM portadora de VH3 (Roben *et al.*, 1995) e, através da sua ativação do TNFR1, pode iniciar a pneumonia estafilocócica (Gomez *et al.*, 2004). Devido ao facto de a proteína A capturar as imunoglobulinas e apresentar atributos tóxicos, a possibilidade de esta molécula de superfície funcionar como uma vacina nos seres humanos não foi pesquisada com rigor. Os inventores demonstram pela primeira vez que as variantes da proteína A que já não são capazes de se ligar às imunoglobulinas, a vWF e a TNFR-1 estão desprovidas do seu potencial toxigénico e são capazes de estimular respostas imunes humorais que protegem contra a doença estafilocócica.

Base molecular da apresentação à superfície e da função da proteína A. A proteína A é sintetizada como um precursor no citoplasma bacteriano e é segregada via o seu péptido sinal YSIRK ao nível da parede transversal, isto é, o septo de divisão celular de estafilococos (FIG. 1) (DeDent *et al.*, 2007; DeDent *et al.*, 2008). Após clivagem do sinal de endereçamento LPXTG C-terminal, a proteína A é ancorada a reticulações do peptidoglicano bacteriano pela sortase A (Schneewind *et al.*, 1995; Mazmanian *et al.*, 1999; Mazmanian *et al.*, 2000). A proteína A é a proteína de superfície de estafilococos mais abundante; a molécula é expressa virtualmente por todas as estirpes de *S. aureus* (Said-Salim *et al.*, 2003; Céspedes *et al.*, 2005; Kennedy *et al.*, 2008). Os estafilococos regeneram

15-20% da sua parede celular por ciclo de divisão (Navarre and Schneewind, 1999). As hidrolases murinas clivam as cadeias de glicano e os péptidos do peptidoglicano, libertando, assim, para o meio extracelular a proteína A com o seu tetrapéptido-dissacarídeo da parede celular C-terminal acoplado (Ton-That *et al.*, 1999). Assim, por desígnio fisiológico, a proteína A encontra-se ancorada à parede celular e apresentada na superfície bacteriana, mas também é libertada para os tecidos circundantes durante a infeção do hospedeiro (Marraffini *et al.*, 2006).

A proteína A captura as imunoglobulinas na superfície bacteriana, e esta atividade bioquímica permite a fuga estafilocócica às respostas imunes inata e adquirida do hospedeiro (Jensen, 1958; Goodyear *et al.*, 2004). De forma interessante, a região X da proteína A (Guss *et al.*, 1984), um domínio de repetição que une os domínios de ligação às IgG ao sinal de endereçamento LPXTG/âncora da parede celular, é talvez a porção mais variável do genoma estafilocócico (Schneewind *et al.*, 1992; Said-Salim, 2003). Cada um dos cinco domínios de ligação às imunoglobulinas da proteína A (SpA), formados por feixes de três hélices e denominados E, D, A, B e C, apresenta propriedades estruturais e funcionais similares (Sjodahl, 1977; Jansson *et al.*, 1998). A solução e a estrutura cristalina do domínio D foram resolvidas com e sem os ligandos Fc e V_H3 (Fab), que se ligam à Proteína A de uma forma não competitiva em locais distintos (Graille 2000).

No complexo da estrutura cristalina, o fragmento Fab interage com a hélice II e a hélice III do domínio D por meio de uma superfície constituída por quatro cadeias β da região VH (Graille 2000). O eixo principal da hélice II do domínio D faz um ângulo de aproximadamente 50° com a orientação das cadeias e a porção inter-helicoidal do domínio D está mais próxima da cadeia C0. O local de interação no fragmento Fab é distante da região constante de cadeia pesada e da cadeia leve da imunoglobulina. A interação envolve os seguintes resíduos do domínio D: Asp-36 da hélice II assim como Asp-37 e Gln-40 na volta entre a hélice II e a hélice III, além de vários outros resíduos com SpA-D (Graille 2000). Ambas as superfícies interatuantes são predominantemente constituídas por cadeias laterais polares, com três resíduos carregados negativamente

no domínio D e dois resíduos carregados positivamente no 2A2 Fab enterrados pela interação, proporcionando uma atração eletrostática global entre as duas moléculas. Das cinco interações polares identificadas entre o fragmento Fab e o domínio D, três são entre cadeias laterais. Estabelece-se uma ponte salina entre Arg-H19 e Asp-36 e duas ligações de hidrogénio entre Tyr-H59 e Asp-37 e entre Asn-H82a e Ser-33. Devido à conservação de Asp-36 e Asp-37 na totalidade dos cinco domínios de ligação às IgG da proteína A, estes resíduos foram selecionados para mutagénese.

Os locais em SpA-D responsáveis pela ligação ao fragmento Fab estão estruturalmente separados da superfície do domínio que medeia a ligação a Fc γ . A interação de Fc γ com o domínio B envolve principalmente resíduos na hélice I, com um menor envolvimento da hélice II (Deisenhofer, 1981; Gouda *et al.*, 1992). Com exceção do resíduo Gln-32, que representa um contacto secundário em ambos os complexos, nenhum dos resíduos que medeia a interação com Fc γ está envolvido na ligação a Fab. Para analisar a relação espacial entre estes diferentes locais de ligação às imunoglobulinas, sobrepuseram-se os domínios da SpA nestes complexos para construir um modelo de um complexo entre Fab, o SpA-domínio D e a molécula Fc γ . Neste modelo ternário, os fragmentos Fab e Fc γ formam uma sanduiche em faces opostas da hélice II, sem sinais de impedimento estéreo de qualquer uma das interações. Estas constatações ilustram a forma como, apesar do seu tamanho reduzido (isto é, 56-61 aa), um domínio da SpA pode exibir simultaneamente ambas as atividades, explicando as observações experimentais de que as interações do fragmento Fab com um domínio individual são não competitivas. Os resíduos para a interação entre SpA-D e Fc γ são Gln-9 e Gln-10.

Em contraste, a ocupação do domínio D por parte da porção Fc das IgG bloqueia a sua interação com o domínio A1 do vWF e provavelmente também com o TNFR1 (O'Seaghdha *et al.*, 2006). As mutações nos resíduos essenciais para a ligação ao fragmento Fc das IgG (F5, Q9, Q10, S11, F13, Y14, L17, N28, I31 e K35) também são necessárias para a ligação ao domínio A1 do vWF e ao TNFR1 (Cedergren *et al.*, 1993; Gomez *et al.*, 2006; O'Seaghdha *et al.*, 2006), ao passo que os resíduos críticos para a interação com VH3 (Q26, G29, F30, S33, D36, D37, Q40,

N43, E47) não têm qualquer impacto nas atividades de ligação de Fc IgG, A1 vWF ou TNFR1 (Jansson *et al.*, 1998; Graille *et al.*, 2000). A atividade de ligação da proteína A ao fragmento Fab das imunoglobulinas visa um subconjunto de células B que expressam IgM relacionadas com a família V_H3 na sua superfície, isto é, estas moléculas atuam como recetores das células B do tipo V_H3 (Roben *et al.*, 1995). Ao interagirem com a SpA, estas células B proliferam rapidamente e depois entregam-se à apoptose, conduzindo a uma eliminação preferencial e prolongada dos linfócitos B do tipo inato (ou seja, células B da zona marginal e células B2 foliculares) (Goodyear and Silverman, 2003; Goodyear and Silverman, 2004). É importante salientar que mais de 40% das células B circulantes são visadas pela interação da proteína A, e a família V_H3 representa a maior família de recetores das células B humanas que confere respostas humorais protetoras contra organismos patogénicos (Goodyear and Silverman, 2003; Goodyear and Silverman, 2004). Assim, a proteína A atua de forma análoga aos superantígenos de estafilococos (Roben *et al.*, 1995), se bem que esta última classe de moléculas, por exemplo SEB, TSST-1, TSST-2, forma complexos com o recetor das células T para estimular inapropriadamente respostas imunes no hospedeiro, precipitando, dessa forma, vertentes características das infeções estafilocócicas (Roben *et al.*, 1995; Tiedemann *et al.*, 1995). No seu conjunto, estas constatações documentam as contribuições da proteína A para o estabelecimento das infeções estafilocócicas e para a modulação das respostas imunes do hospedeiro.

Variante da proteína A não toxigénica. Os inventores desenvolveram uma variante não toxigénica da proteína A de estafilococos e, munidos deste reagente, procuraram pela primeira vez medir a resposta imune de animais à imunização com a proteína A. Além disso, os inventores abordam a questão de a imunização dos animais com uma variante não toxigénica da proteína A poder ou não gerar respostas imunes que dão origem a uma imunidade protetora contra a infeção estafilocócica.

Para perturbar as atividades de ligação da proteína A ao fragmento Fc das IgG, ao domínio A1 do vWF e ao TNFR1, os resíduos de glutamina (Q) 9 e 10 [a numeração aqui é derivada da numeração estabelecida para o domínio D da SpA] foram

modificados, gerando-se substituições por lisina ou glicina para ambas as glutaminas, na expectativa de estas substituições abolirem as ligações iónicas formadas entre a proteína A de tipo selvagem e os seus ligandos. O efeito adicionado da dupla substituição por lisina poderá ser o facto de estes resíduos carregados positivamente instituírem uma carga repelente para as imunoglobulinas. Para perturbar a ligação a V_H3 Fab das IgM, os inventores seleccionaram os resíduos de aspartato (D) 36 e 37 do SpA-D, em que cada um deles é necessário para a associação da proteína A ao recetor das células B. D36 e D37 foram ambos substituídos por alanina. As mutações Q9,10K e D36,37A foram combinadas na molécula recombinante SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} e testadas relativamente aos atributos de ligação da proteína A.

Em resumo, a sequência genómica da proteína A (*spa*) de *Staphylococcus aureus* N315 foi amplificada por PCR com os iniciadores (GCTGCACATATGGCGCAACACGATGAAGCTCAAC [iniciador 5'] (SEQ ID NO:35) e AGTGGATCCTTATGCTTTGTTAGCATCTGC [iniciador 3'] (SEQ ID NO:36)), clonada no vetor pET15b (pYSJ1, codões 48-486) (Stranger-Jones, *et al.*, 2006) e o plasmídeo recombinante foi transformado em *E. coli* BL21 (DE3) (Studier *et al.*, 1990). O produto proteína A derivado de pYSJ1 compreende os resíduos 36-265 da SpA fundidos com a marca His N-terminal (MGSSHHHHHSSGLVPRGS (SEQ ID NO:37)). Após expressão indutível por IPTG, a SpA recombinante com uma marca His₆ N-terminal foi purificada por cromatografia de afinidade numa resina de Ni-NTA (Stranger-Jones *et al.*, 2006). O domínio D da SpA (SpA-D) foi amplificado por PCR com um par de iniciadores específicos (AACATATGTTCAACAAAGATCAACAAAGC [iniciador 5'] (SEQ ID NO:38) e AAGGATCCAGATTCGTTTAATTTTTTAGC [iniciador 3'] (SEQ ID NO:39)), subclonado no vetor pET15b (pHAN1, codões de *spa* 212-261) e o plasmídeo recombinante foi transformado em *E. coli* BL21 (DE3) para expressar e purificar a proteína recombinante com uma marca His₆ N-terminal. Para gerar as mutações na sequência codificante do SpA-D, sintetizaram-se conjuntos de dois pares de iniciadores (para as substituições de D por A: CTTCAATTCAAAGTCTTAAAGCCGCCCAAGCCAAAGCACTAAC [iniciador 5'] (SEQ ID NO:40) e GTTAGTGCTTTGGCTTGGGGCGGCTTTAAGACTTTGAATGAAG [iniciador 3'] (SEQ ID NO:41); para as substituições de Q por K: CATATGTTCAACAAAGATAAAAAAAGCGCCTTCTATGAAATC [iniciador 5'] (SEQ ID NO:42) e GATTTTCATAGAAGGCGCTTTTTTTTATCTTTGTTGAACATATG

[iniciador 3'] (SEQ ID NO:43); e para as substituições de Q por G: CATATGTTCAACAAAGATGGAGGAAGCGCTTCTATGAAATC [iniciador 5'] (SEQ ID NO:44) e GATTCATAGAAGGCGCTTCCTCCATCTTTGTTGAACATATG' [iniciador 3'] (SEQ ID NO:45)). Os iniciadores foram usados para protocolos de mutagênese *quick-change*. Após a mutagênese, as sequências de ADN foram confirmadas para cada uma das proteínas recombinantes: SpA, SpA-D, SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} e SpA-D_{Q9,10K;D36,37A}. Todas as proteínas foram purificadas a partir dos lisados de *E. coli* recombinante utilizando cromatografia em Ni-NTA e subsequentemente dialisadas contra PBS e armazenadas a 4 °C.

Para medir a ligação da imunoglobulina à proteína A e às suas variantes, diluíram-se 200 µg da proteína purificada num volume de 1 ml de tampão da coluna (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM; pH 7,5) e introduziu-se numa coluna de Ni-NTA pré-equilibrada (volume do leito de 1 ml). As colunas foram lavadas com 10 ml de tampão da coluna. Diluíram-se 200 µg de IgG humana purificada num volume total de 1 ml de tampão da coluna e aplicou-se esta solução a cada uma das colunas carregadas com proteína A e as suas variantes. As colunas foram subsequentemente lavadas com 5 ml de tampão de lavagem (imidazol 10 mM em tampão da coluna) e 5 ml de tampão da coluna. As amostras de proteína foram eluídas com 2 ml de tampão de eluição (imidazol 500 mM em tampão da coluna), recolheram-se as frações e submeteram-se alíquotas a eletroforese em gel SDS-PAGE, seguida de coloração com azul de Coomassie. Como ilustrado na FIG. 1C, tanto a proteína A de tipo selvagem (SpA) como o respetivo SpA-domínio D retiveram a imunoglobulina durante a cromatografia. Em contraste, a variante SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} não se ligou à imunoglobulina.

Para quantificar a ligação da proteína A e das suas variantes à porção Fc da imunoglobulina e ao domínio VH3 de Fab, utilizou-se imunoglobulina G humana [hIgG] conjugada com HRP, a porção Fc de IgG humana [hFc] e a porção F(ab)₂ de IgG humana [hF(ab)₂], assim como ensaios ELISA para quantificar a quantidade relativa de ligação à proteína A e suas variantes. Os resultados na FIG. 1D demonstram a ligação da SpA e SpA-D a hIgG e hFc, enquanto SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} e SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} apresentaram apenas atividades de ligação de fundo. A SpA ligou quantidades similares de hFc e hF(ab)₂. A ligação de SpA-D a

hF(ab)₂, contudo, foi reduzida em comparação com a SpA completa. Este resultado sugere que a presença de múltiplos domínios de ligação a IgG poderá aumentar cooperativamente a capacidade da proteína A para se ligar ao recetor das células B. Quando comparadas com o poder de ligação reduzido de SpA-D para hF(ab)₂, das duas variantes apenas SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} mostrou uma redução significativa da capacidade de ligação ao domínio VH3 da imunoglobulina. De forma a examinar os atributos toxigénicos do SpA-D e respetivas variantes, as proteínas purificadas foram injetadas em ratinhos, que foram sacrificados após 4 horas para remover os baços. O tecido do órgão foi homogeneizado, o material capsular foi removido e as células B foram coradas com anticorpos CD19 fluorescentes. Após a análise por FACS para quantificar a abundância de células B nos tecidos esplénicos, observou-se que o SpA-D provocou uma queda de 5% na contagem de células B em comparação com um controlo simulado (*mock*) (PBS) (FIG. 1E). Em contraste, a variante SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} não causou uma redução nas contagens de células B, indicando que a molécula mutante havia perdido os seus atributos toxigénicos de estimular a proliferação e morte das células B (FIG. 1E). Em resumo, as substituições de aminoácidos nos resíduos Q9, Q10, D36 e D37 do SpA-D aboliram a capacidade dos domínios da proteína A para ligarem as imunoglobulinas ou exercerem funções toxigénicas nos tecidos humanos e animais.

As variantes da proteína A não toxigénicas conferem proteção vacinal. Para testar se a proteína A e as suas variantes podem ou não funcionar como antigénios vacinais, as proteínas SpA, SpA-D, SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} e SpA-D_{Q9,10G;D36,37A} foram emulsionadas com adjuvante completo ou incompleto de Freund e utilizadas para imunizar ratinhos BALB/c com 4 semanas de idade no dia 1 e no dia 11, com 50 µg de proteína purificada. Os coortes de animais (n=5) foram analisados em termos das respostas imunes humorais à imunização, por meio de sangramento dos animais antes (dia 0) e após o regime de imunização (dia 21). A Tabela 4 indica que os ratinhos imunizados produziram apenas uma resposta imune humoral modesta contra a proteína A de tipo selvagem ou o seu módulo SpA-D, ao passo que a quantidade de anticorpo produzido no seguimento da imunização com SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} ou SpA-D_{Q9,10G;D36,37A} sofreu um aumento de quatro a cinco vezes. Após a provocação intravenosa com 1 ×

10^7 UFC de *S. aureus* Newman, os animais foram mortos no dia 4, os seus rins removidos e subsequentemente analisados quer quanto à carga estafilocócica (por plaqueamento do homogenato do tecido em placas contendo ágar-ágar e contabilização das unidades formadoras de colónias, UFC) quer quanto à histopatologia. Como esperado, os ratinhos imunizados de forma simulada (PBS) (n=19) albergaram $6,46 \log_{10}$ ($\pm 0,25$) UFC no tecido renal e as lesões infecciosas estavam organizadas em $3,7$ ($\pm 1,2$) abscessos por órgão (n=10) (Tabela 4). A imunização dos animais com SpA levou a uma redução de $2,51 \log_{10}$ UFC no dia 5 (P=0,0003) com $2,1$ ($\pm 1,2$) abscessos por órgão. Os últimos resultados indicam que não existiu uma redução significativa da formação de abscessos (P=0,35). A imunização com SpA-D produziu resultados idênticos: uma redução de $2,03 \log_{10}$ UFC no dia 5 (P=0,0001) com $1,5$ ($\pm 0,8$) abscessos por órgão (P=0,15). Em contraste, a imunização com SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} ou SpA-D_{Q9,10G;D36,37A} criou uma proteção acrescida, com reduções de $3,07 \log_{10}$ e $3,03 \log_{10}$ UFC no dia 4, respetivamente (significância estatística P<0,0001 para ambas as observações). Além disso, a imunização com ambas as espécies SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} e SpA-D_{Q9,10G;D36,37A} gerou uma proteção significativa contra a formação de abscessos estafilocócicos, na medida em que apenas foram identificadas $0,5$ ($\pm 0,4$) e $0,8$ ($\pm 0,5$) lesões infecciosas por órgão (P=0,02 e P=0,04). Assim, a imunização com variantes da proteína A não toxigénicas gera respostas imunes humorais aumentadas para a proteína A e confere imunidade protetora contra a provocação por estafilococos. Estes resultados indicam que a proteína A é um candidato ideal para uma vacina humana que previna a doença por *S. aureus*.

Estes resultados emocionantes têm várias implicações para o design de uma vacina humana. Primeiro, a geração de mutações de substituição que afetam a funcionalidade dos domínios de ligação às imunoglobulinas da proteína A, sozinhos ou numa combinação de dois ou mais domínios, pode criar variantes não toxigénicas apropriadas para o desenvolvimento de uma vacina. Parece provável que uma combinação de domínios mutantes de ligação às IgG, assemelhando-se de perto à estrutura da proteína A, possa produzir respostas imunes humorais ainda melhores, tal como é aqui comunicado apenas para o SpA-D. Adicionalmente, um atributo provável dos anticorpos

específicos para a proteína A poderá ser o facto de a interação dos locais de ligação ao antigénio com a superfície microbiana poder neutralizar a capacidade dos estafilococos para capturar as imunoglobulinas via a sua porção Fc ou para estimular o recetor das células B via as atividades de ligação a VH3.

Tabela 4. Variantes da proteína A não toxigênicas como antígenos vacinais que previnem a doença por *S. aureus*

Antígeno	^a log ₁₀ UFC g ⁻¹	^b Redução	Valor P	Título de IgG	^c Abcesso à superfície	Redução	^e Histopatologia	Redução	^f Valor P
Carga bacteriana no rim (n = número de ratinhos)		Formação de abscessos nos ratinhos (n = número de ratinhos)							
Simulação	6,46 ± 0,25 (n=19)	-	-	<100	14/19 (70%)	-	3,7 ± 1,2 (n=10)	-	-
SpA	3,95 ± 0,56 (n=20)	2,51	0,0003	1706 ± 370	10/20 (50%)	32%	2,1 ± 1,2 (n=10)	2,2	0,35
SpA-D	4,43 ± 0,41 (n=18)	2,03	0,0001	381 ± 27	10/18 (55%)	25%	1,5 ± 0,8 (n=10)	2,2	0,15
SpA-D1	3,39 ± 0,50 (n=19)	3,07	<0,0001	5600 ± 801	6/20 (30%)	59%	0,5 ± 0,4 (n=10)	3,2	0,02
SpA-D2	3,43 ± 0,46 (n=19)	3,03	<0,0001	3980 ± 676	6/19 (32%)	57%	0,8 ± 0,5 (n=10)	2,9	0,04

^aMédia da carga estafilocócica, calculada como log₁₀ UFC g⁻¹, em tecidos renais homogeneizados, 4 dias após a infecção em coortes de 18 a 20 ratinhos BALB/c. O erro padrão da média (±EPM) está indicado.

^cA significância estatística foi calculada com o teste t de Student e os valores P foram registrados; os valores P <0,05 foram considerados significativos.

^bRedução da carga bacteriana calculada como log₁₀ UFC g⁻¹.

^dA formação de abscessos em tecidos renais, quatro dias após a infecção, foi medida por inspeção macroscópica (% positiva).

^eHistopatologia de secções finas, coradas com hematoxilina-eosina, dos rins provenientes de dez animais; o número de abscessos por rim foi registrado, calculando-se a média para obter a média final (±EPM).

^fA significância estatística foi calculada com o teste t de Student e os valores P foram registrados; os valores P <0,05 foram considerados significativos.

SpA-D1 e SpA-D2 representam SpA-D_{9,10K;D36,37A} e SpA-D_{9,10G;D36,37A}, respectivamente.

Proteção vacinal no abscesso murino, na infecção letal murina e em modelos de pneumonia murina. Foram estabelecidos três modelos animais para o estudo da doença infecciosa por *S. aureus*. Estes modelos são aqui usados para examinar o nível de imunidade protetora conferida por meio da geração de anticorpos específicos para a proteína A.

MATERIAIS E MÉTODOS

Abcesso murino - Os ratinhos BALB/c (fêmea com 24 dias de idade, 8-10 ratinhos por grupo, Charles River Laboratories, Wilmington, MA) são imunizados por injeção intramuscular na pata traseira com a proteína purificada (Chang *et al.*, 2003; Schneewind *et al.*, 1992). A proteína SpA, SpA-D ou SpA-DQ9,10K;D36,37A (50 µg de proteína) purificada é administrada nos dias 0 (emulsionada 1:1 com adjuvante completo de Freund) e 11 (emulsionada 1:1 com adjuvante incompleto de Freund). Retiram-se amostras de sangue por sangramento retro-orbital nos dias 0, 11 e 20. Os soros são examinados por ELISA quanto aos títulos de IgG para a atividade de ligação específica a SpA-D e SpA-DQ9,10K;D36,37A. Os animais imunizados são provocados no dia 21 por injeção retro-orbital de 100 µl de uma suspensão de *S. aureus* Newman ou *S. aureus* USA300 (1×10^7 ufc). Para este fim, as culturas de *S. aureus* Newman crescidas durante a noite são diluídas de 1:100 em meio de soja tríptica fresco e crescidas durante 3 h a 37 °C. Os estafilococos são centrifugados, lavados duas vezes e diluídos com PBS para fornecer uma A_{600} de 0,4 (1×10^8 ufc per ml). As diluições são verificadas experimentalmente através de plaqueamento em ágar-ágar e formação de colónias. Os ratinhos são anestesiados por injeção intraperitoneal de 80-120 mg de cetamina e 3-6 mg de xilazina por quilograma de peso corporal e infetados por injeção retro-orbital. No dia 5 ou 15 após a provocação, os ratinhos sofrem eutanásia por inalação de CO₂ comprimido. Os rins são removidos e homogeneizados em Triton X-100 a 1%. As alíquotas são diluídas e plaqueadas em meio agarizado para a determinação em triplicado de ufc. Para a histologia, o tecido renal é incubado à temperatura ambiente em formalina a 10% durante 24 h. Os tecidos são incluídos em parafina, cortados em secções finas, corados com hematoxilina-eosina e examinados por microscopia.

Infeção letal murina - Os ratinhos BALB/c (fêmea com 24 dias de idade, 8-10 ratinhos por grupo, Charles River Laboratories, Wilmington, MA) são imunizados por injeção intramuscular na pata traseira com SpA, SpA-D ou SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} purificada (50 µg de proteína). A vacina é administrada nos dias 0 (emulsionada 1:1 com adjuvante completo de Freund) e 11 (emulsionada 1:1 com adjuvante incompleto de Freund). Retiram-se amostras de sangue por sangramento retro-orbital nos dias 0, 11 e 20. Os soros são examinados por ELISA quanto aos títulos de IgG para a atividade de ligação específica a SpA-D e SpA-D_{Q9,10K;D36,37A}. Os animais imunizados são provocados no dia 21 por injeção retro-orbital de 100 µl de uma suspensão de *S. aureus* Newman ou *S. aureus* USA300 (1×10^7 ufc) (34). Para este fim, as culturas de *S. aureus* Newman crescidas durante a noite são diluídas de 1:100 em meio de soja tríptica fresco e crescidas durante 3 h a 37 °C. Os estafilococos são centrifugados, lavados duas vezes, diluídos com PBS para fornecer uma A₆₀₀ de 0,4 (1×10^8 ufc per ml) e concentrados. As diluições são verificadas experimentalmente através de plaqueamento em ágar-ágar e formação de colónias. Os ratinhos são anestesiados por injeção intraperitoneal de 80-120 mg de cetamina e 3-6 mg de xilazina por quilograma de peso corporal. Os animais imunizados são provocados no dia 21 por injeção intraperitoneal com 2×10^{10} ufc de *S. aureus* Newman ou $3-10 \times 10^9$ ufc de isolados clínicos de *S. aureus*. Os animais são monitorizados durante 14 dias e a doença letal é registada.

Modelo de pneumonia murina - As estirpes de *S. aureus* Newman ou USA300 (LAC) são crescidas a 37 °C em meio de soja tríptica/ágar-ágar até uma DO₆₆₀ de 0,5. Alíquotas de 50 ml da cultura são centrifugadas, lavadas com PBS e suspensas em 750 µl de PBS para os estudos de mortalidade ($3-4 \times 10^8$ UFC por volume de 30 µl) ou 1250 µl de PBS (2×10^8 UFC por volume de 30 µl) para as experiências de carga bacteriana e histopatologia (2, 3). Para a infeção dos pulmões, ratinhos C57BL/6J com 7 semanas de idade (The Jackson Laboratory) são anestesiados antes da inoculação de 30 µl de uma suspensão de *S. aureus* na narina esquerda. Os animais são colocados na gaiola em decúbito dorsal para recuperarem e são observados durante 14 dias. Para a imunização ativa, ratinhos com 4 semanas de idade recebem 20 µg de SpA-D ou SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} em CFA no dia 0 pela via i.m., seguida de um reforço com 20 µg de

SpA-D ou SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} em adjuvante incompleto de Freund (IFA) no dia 10. Os animais são provocados com *S. aureus* no dia 21. Os soros são recolhidos antes da imunização e no dia 20 para avaliar a produção de anticorpos específicos. Para os estudos de imunização passiva, ratinhos com 7 semanas de idade recebem 100 µl de SNC (soro normal de coelho) ou de antissoro de coelho específico para SpA-D via injeção i.p. 24 h antes da provocação. Para avaliar os correlativos patológicos da pneumonia, os animais infetados são mortos via inalação forçada de CO₂ antes da remoção de ambos os pulmões. O pulmão direito é homogeneizado para a determinação da carga bacteriana pulmonar. O pulmão esquerdo é colocado em formalina a 1% e incluído em parafina, cortado em secções finas, corado com hematoxilina-eosina e analisado por microscopia.

Anticorpos de coelho - Utilizam-se 200 µg de SpA-D ou SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} purificada como imunogénio para a produção de antissoros de coelho. 200 µg da proteína são emulsionados com CFA para injeção no dia 0, seguida de injeções de reforço com 200 µg da proteína emulsionada com IFA nos dias 21 e 42. Os títulos dos anticorpos de coelho são determinados por ELISA. Os anticorpos purificados são obtidos por cromatografia de afinidade do soro de coelho, utilizando Sepharose com SpA-D ou SpA-D_{Q9,10K;D36,37A}. A concentração dos anticorpos eluídos é medida através da absorvância A₂₈₀, e os títulos dos anticorpos específicos são determinados por ELISA.

Imunização ativa com variantes do domínio D da SpA - Para determinar a eficácia da vacina, os animais são imunizados de forma ativa com SpA-D ou SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} purificada. Como controlo, os animais são imunizados apenas com adjuvante. Os títulos dos anticorpos contra as preparações da proteína A são determinados usando SpA-D ou SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} como antigénios. Repare-se que a variante SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} não se consegue ligar à porção Fc nem Fab da IgG. Utilizando os modelos de doença infecciosa descritos acima, mede-se qualquer redução da carga bacteriana (abcesso e pneumonia murina), evidência histopatológica de doença estafilocócica (abcesso e pneumonia murina) e proteção contra a doença letal (pneumonia e provocação letal murina).

Imunização passiva com anticorpos policlonais de coelho purificados por afinidade, produzidos contra variantes do domínio D da SpA. Para determinar a imunidade protetora dos anticorpos de coelho específicos para a proteína A, os ratinhos são imunizados passivamente com 5 mg/kg de anticorpos de coelho derivados de SpA-D ou SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} purificados. Ambas as preparações de anticorpos são purificadas por cromatografia de afinidade, utilizando SpA-D ou SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} imobilizada. Como controlo, os animais são imunizados passivamente com anticorpos rV10 (um antigénio protetor contra a peste que não tem nenhum impacto no resultado das infeções estafilocócicas). Os títulos dos anticorpos contra todas as preparações da proteína A são determinados utilizando SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} como antigénio, uma vez que esta variante não se consegue ligar à porção Fc nem à porção Fab da IgG. Utilizando os modelos de doença infecciosa descritos acima, mede-se a redução da carga bacteriana (abcesso e pneumonia murina), a evidência histopatológica de doença estafilocócica (abcesso e pneumonia murina) e a proteção contra a doença letal (pneumonia e provocação letal murina).

EXEMPLO 2

VACINA DE PROTEÍNA A NÃO TOXIGÉNICA PARA A INFEÇÃO POR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RESISTENTE À METICILINA

Os isolados clínicos de *S. aureus* expressam a proteína A (Shopsin *et al.*, 1999), cujo produto de tradução primário é constituído por um péptido sinal N-terminal (DeDent *et al.*, 2008), cinco domínios de ligação a Ig (designados por E, D, A, B e C) (Sjodahl, 1977), uma região X com repetições variáveis de um péptido com oito resíduos (Guss *et al.*, 1984) e um sinal de endereçamento C-terminal para o ancoramento da SpA à parede celular (Schneewind *et al.*, 1992; Schneewind *et al.*, 1995) (FIG. 1A-1B). Com base na homologia de aminoácidos (Uhlen *et al.*, 1984), na estrutura em feixe de três hélices α dos domínios de ligação a Ig (Deisenhofer *et al.*, 1978; Deisenhofer *et al.*, 1981) e nas suas interações atómicas com V_H3 de Fab (Graille *et al.*, 2000) ou Fc γ (Gouda *et al.*, 1998), as glutaminas 9 e 10, assim como os aspartatos 36 e 37 foram selecionados como sendo críticos para a associação da SpA aos anticorpos ou ao recetor das células B, respetivamente. As

substituições Gln9Lys, Gln10Lys, Asp36Ala e Asp37Ala foram introduzidas no domínio D para gerar SpA-D_{KKAA} (FIG. 1B). A capacidade de SpA-D ou SpA-D_{KKAA} isolada para se ligar à IgG humana foi analisada por cromatografia de afinidade (FIG. 1D). SpA-D com uma marca de poli-histidina, assim como a SpA completa retiveram a IgG humana em Ni-NTA, ao passo que SpA-D_{KKAA} e um controlo negativo (SrtA) não retiveram (FIG. 1C). Observou-se um resultado similar com o fator de von Willebrand (Hartleib *et al.*, 2000) que, juntamente com o recetor 1 do fator de necrose tumoral (TNFR1) (Gomez *et al.*, 2004), também se pode ligar à proteína A via as glutaminas 9 e 10 (FIG. 1D). A imunoglobulina humana compreende 60-70% de IgG do tipo V_H3. Os inventores distinguem entre o domínio Fc e a ativação do recetor das células B das imunoglobulinas e mediram a associação dos fragmentos Fc γ e F(ab)₂ humanos, em que ambos se ligam à SpA completa ou a SpA-D, mas não a SpA-D_{KKAA} (FIG. 1D). A injeção de SpA-D na cavidade peritoneal de ratinhos resultou numa expansão das células B, seguida de colapso apoptótico dos linfócitos CD19+ no tecido esplénico de ratinhos BALB/c (Goodyear and Silverman, 2003) (FIG. 1E). A atividade de superantigénio das células B não foi observada após a injeção com SpA-D_{KKAA}, e a coloração de TUNEL do tecido esplénico não detetou o aumento de células apoptóticas que se segue à injeção de SpA ou SpA-D (FIG. 1E).

Os anticorpos contra SpA-D_{KKAA} protegem contra as infeções por MSSA e MRSA. Ratinhos BALB/c naïve com seis semanas de idade foram injetados com 50 μ g de cada uma das espécies SpA, SpA-D ou SpA-D_{KKAA} purificadas e emulsionadas em CFA e reforçados com o mesmo antigénio emulsionado em IFA. Em conformidade com a hipótese de que SpA-D promove o colapso apoptótico das populações de células B clonais ativadas, os inventores observaram um título dez vezes mais elevado dos anticorpos específicos para SpA-D_{KKAA} após a imunização dos ratinhos com a variante não toxigénica, em comparação com o superantigénio das células B (SpA-D versus SpA-D_{KKAA} P <0,0001; Tabela 5). Os títulos dos anticorpos produzidos pela imunização com a SpA completa foram mais elevados que os gerados por SpA-D (P=0,0022), o que provavelmente se deve ao maior tamanho e à estrutura de domínios reiterativos deste antigénio (Tabela 5). Em todo o caso, mesmo a SpA desencadeou títulos de anticorpos mais baixos do que a SpA-D_{KKAA} (P=0,0003), que

compreende apenas 50 aminoácidos da proteína A (520 resíduos, SEQ ID NO:33). Os ratinhos imunizados foram provocados por inoculação intravenosa com *S. aureus* Newman, e a capacidade dos estafilococos para semear abscessos nos tecidos renais foi examinada por necropsia quatro dias após a provocação. No tecido renal homogeneizado de ratinhos imunizados de forma simulada (PBS/adjuvante), determinou-se uma carga estafilocócica média de $6,46 \log_{10}$ UFC g^{-1} (Tabela 5). A imunização dos ratinhos com SpA ou SpA-D conduziu a uma redução da carga estafilocócica. Contudo, os animais vacinados com SpA-D_{KKAA} apresentaram uma redução ainda maior, $3,07 \log_{10}$ UFC g^{-1} , de *S. aureus* Newman nos tecidos renais ($P < 0,0001$; Tabela 5). A formação de abscessos nos rins foi analisada por histopatologia (FIG. 2). Os animais imunizados de forma simulada albergaram uma média de $3,7 (\pm 1,2)$ abscessos por rim (Tabela 5). A vacinação com SpA-D_{KKAA} reduziu o número médio de abscessos para $0,5 (\pm 0,4)$ ($P = 0,0204$), ao passo que a imunização com SpA ou SpA-D não originou uma redução significativa do número de abscessos (Tabela 5). As lesões dos animais vacinados com SpA-D_{KKAA} foram menores, com menos PMN infiltrantes e estavam caracteristicamente isentas de comunidades do abscesso estafilocócico (Cheng *et al.*, 2009) (FIG. 2). Os abscessos nos animais que haviam sido imunizados com SpA ou SpA-D apresentaram a mesma estrutura global das lesões dos animais imunizados de forma simulada (FIG. 2).

Os inventores examinaram se a imunização com SpA-D_{KKAA} pode ou não proteger os ratinhos contra estirpes de MRSA e selecionaram o isolado USA300 LAC para a provocação dos animais (Diep *et al.*, 2006). Esta estirpe de CA-MRSA altamente virulenta disseminou-se rapidamente pelos Estados Unidos, causando uma morbidade e uma mortalidade humanas significativas (Kennedy *et al.*, 2008). Em comparação com os ratinhos de controlo que receberam adjuvante, os animais imunizados com SpA-D_{KKAA} apresentaram uma redução de $1,07 \log_{10}$ UFC g^{-1} da carga bacteriana dos tecidos renais infetados. O exame histopatológico do tecido renal após a provocação com *S. aureus* USA300 revelou que o número médio de abscessos foi reduzido de $4,04 (\pm 0,8)$ para $1,6 (\pm 0,6)$ ($P = 0,02774$). Em contraste, a imunização com SpA ou SpA-D não causou uma redução significativa da carga bacteriana ou da formação de abscessos (Tabela 5).

Os anticorpos para SpA-D_{KKAA} impedem a interação imunoglobulina-proteína A. Imunizaram-se coelhos com SpA-D_{KKAA} e os anticorpos específicos foram purificados numa coluna de afinidade com SpA-D_{KKAA}, seguida de SDS-PAGE (FIG. 3). A IgG específica para SpA-D_{KKAA} foi clivada com pepsina para gerar os fragmentos Fc γ e F(ab)₂, em que o último destes foi purificado por cromatografia numa coluna com SpA-D_{KKAA} (FIG. 3). A ligação da IgG humana ou do vWF a SpA ou SpA-D foi perturbada pelo fragmento F(ab)₂ específico para SpA-D_{KKAA}, indicando que os anticorpos derivados de SpA-D_{KKAA} neutralizam a função de superantigénio das células B da proteína A, assim como as suas interações com as Ig (FIG. 3).

SpA_{KKAA} gera respostas imunes protetoras melhoradas. Para melhorar adicionalmente as propriedades vacinais para a proteína A não toxigénica, os inventores geraram a variante SpA_{KKAA}, que inclui a totalidade dos cinco domínios de ligação às imunoglobulinas com quatro substituições de aminoácidos - correspondentes às substituições Gln9Lys, Gln10Lys, Asp36Ala e Asp37Ala do domínio D - em cada um dos seus cinco domínios (E, D, A, B e C). A variante SpA_{KKAA} com uma marca de polihistidina foi purificada por cromatografia de afinidade e analisada por SDS-PAGE corado com azul de Coomassie (FIG. 4). Ao contrário da SpA completa, a SpA_{KKAA} não se ligou a IgG humana, Fc e F(ab)₂ nem a vWF (FIG. 4). A variante SpA_{KKAA} não mostrou atividade de superantigénio das células B, uma vez que a injeção da variante em ratinhos BALB/c não causou um esgotamento das células B CD19+ no tecido esplénico (FIG. 4). A vacinação com SpA_{KKAA} gerou títulos de anticorpos específicos mais elevados do que a imunização com SpA-D_{KKAA} e forneceu ratinhos com uma proteção elevada contra a provocação com *S. aureus* USA300 (Tabela 5). Quatro dias após a provocação, os animais vacinados com SpA_{KKAA} albergavam menos 3,54 log₁₀ UFC g⁻¹ estafilococos nos tecidos renais (P = 0,0001) e também causaram uma maior redução do número de abscessos (P=0,0109) (Tabela 5). Como teste para determinar se as vacinas de proteína A afetam outras estirpes de MRSA, os ratinhos foram provocados com o isolado de MRSA resistente à vancomicina japonês Mu50 (Hiramatsu *et al.*, 1997). De forma idêntica aos resultados observados com o isolado de MRSA USA300, os animais vacinados com SpA_{KKAA} albergavam menos estafilococos Mu50 nos

tecidos renais do que os animais imunizados de forma simulada ($P=0,0248$; FIG. 7).

A transferência passiva de anticorpos específicos para a SpA previne a doença estafilocócica. A variante SpA_{KKAA} foi utilizada para imunizar coelhos. Os anticorpos de coelho específicos para SpA-D_{KKAA} ou SpA_{KKAA} foram purificados por afinidade em matrizes contendo o antigénio cognato imobilizado, sendo depois injetados numa concentração de 5 mg kg⁻¹ de peso corporal na cavidade peritoneal de ratinhos BALB/c (Tabela 6). Vinte e quatro horas mais tarde, determinaram-se os títulos dos anticorpos específicos no soro e os animais foram provocados por inoculação intravenosa com *S. aureus* Newman. A transferência passiva reduziu a carga estafilocócica nos tecidos renais para os anticorpos específicos para SpA-D_{KKAA} ($P=0,0016$) ou SpA_{KKAA} ($P=0,0005$). No exame histopatológico, ambos os anticorpos reduziram a abundância de lesões nos rins de ratinhos provocados com *S. aureus* Newman (Tabela 6). Em conjunto, estes resultados revelam que, após imunização com SpA-D_{KKAA} ou SpA_{KKAA}, é conferida proteção vacinal pelos anticorpos que neutralizam a proteína A.

Os inventores também procuraram determinar se os anticorpos específicos para a proteína A podem ou não proteger os animais contra uma provocação letal. Ratinhos BALB/c foram imunizados ativa ou passivamente para produzir anticorpos contra SpA_{KKAA} e depois foram provocados por injeção intraperitoneal com doses letais de *S. aureus* Newman (FIG. 6). Os anticorpos contra SpA_{KKAA}, produzidos quer por imunização ativa ($P=0,0475$; SpA_{KKAA} versus simulação) quer por imunização passiva ($P=0,0493$; SpA_{KKAA} versus simulação), conferiram proteção contra a provocação letal com *S. aureus* Newman (FIG. 6).

Tabela 5. Imunização ativa de ratinhos com vacinas de proteína A

Carga estafilocócica e formação de abscessos no tecido renal						
Antígeno	^a log ₁₀ UFC g ⁻¹	^b Valor P	^c Redução (log ₁₀ UFC g ⁻¹)	^d Título de IGG	^e Número de abscessos	^b Valor P
Provocação com <i>S. aureus</i> Newman						
Simulação	6,46 ± 0,25	-	-	<100	3,7 ± 1,2	-
SpA	3,95 ± 0,56	0,0003	2,51	1706 ± 370	2,1 ± 1,2	0,3581
SpA-D	4,43 ± 0,41	0,0001	2,03	381 ± 27	1,5 ± 0,8	0,1480
SpA-D _{KKA}	3,39 ± 0,50	<0,0001	3,07	5600 ± 801	0,5 ± 0,4	0,0204
Provocação com <i>S. aureus</i> USA300 (IAC)						
Simulação	7,20 ± 0,24	-	-	<100	4,0 ± 0,8	-
SpA	6,81 ± 0,26	0,2819	0,39	476 ± 60	3,3 ± 1,0	0,5969
SpA-D	6,34 ± 0,52	0,1249	0,86	358 ± 19	2,2 ± 0,6	0,0912
SpA-D _{KKA}	6,00 ± 0,42	0,0189	1,20	3710 ± 1147	1,6 ± 0,6	0,0277
SpA _{KKA}	3,66 ± 0,76	0,0001	3,54	10200 ± 2476	1,2 ± 0,5	0,0109

^aMédia da carga estafilocócica, calculada como log₁₀ UFC g⁻¹, em tecidos renais homogeneizados, 4 dias após a infecção em coortes de quinze a vinte ratinhos BALB/c por imunização. Está ilustrado um representante de três experiências animais independentes e reprodutíveis. O erro padrão da média (±EPM) está indicado.

^bA significância estatística foi calculada com o teste t de Student desemparelhado bicaudal e os valores P foram registrados; os valores P <0,05 foram considerados significativos.

^cRedução da carga bacteriana calculada como log₁₀ UFC g⁻¹.

^dMédia de cinco títulos de IGG sérica escolhidos aleatoriamente, que foram medidos por ELISA antes da infecção estafilocócica.

^eHistopatologia de secções finas, coradas com hematoxilina-eosina, dos rins provenientes de dez animais; o número médio de abscessos por rim foi registrado, calculando-se novamente a média para obter a média final (±EPM).

Tabela 6. Imunização passiva de ratinhos com anticorpos contra a proteína A

^a Anticorpo	Carga estafilocócica e formação de abscessos no tecido renal					
	^b log ₁₀ UFC g ⁻¹	^c Valor P	^d Redução (log ₁₀ UFC g ⁻¹)	^e Título de IgG	^f Número de abscessos	^c Valor P
Simulação	7,10 ± 0,14	-	-	<100	4,5 ± 0,8	-
α-SpA-D _{KKA}	5,53 ± 0,43	0,0016	1,57	466 ± 114	1,9 ± 0,7	0,0235
α-SpA _{KKA}	5,69 ± 0,34	0,0005	1,41	1575 ± 152	1,6 ± 0,5	0,0062

^aOs anticorpos purificados por afinidade foram injetados na cavidade peritoneal de ratinhos BALB/c, numa concentração de 5 mg kg⁻¹, vinte e quatro horas antes da provocação intravenosa com 1 × 10⁷ UFC de *S. aureus* Newman.

^bMédia da carga estafilocócica, calculada como log₁₀ UFC g⁻¹, em tecidos renais homogeneizados, 4 dias após a infeção em coortes de quinze ratinhos BALB/c por imunização. Está ilustrado um representante de duas experiências animais independentes e reprodutíveis. O erro padrão da média (±EPM) está indicado.

^cA significância estatística foi calculada com o teste t de Student desemparelhado bicaudal e os valores P foram registados; os valores P < 0,05 foram considerados significativos.

^dRedução da carga bacteriana calculada como log₁₀ UFC g⁻¹.

^eMédia de cinco títulos de IgG sérica escolhidos aleatoriamente, que foram medidos por ELISA antes da infeção estafilocócica.

^fHistopatologia de secções finas, coradas com hematoxilina-eosina, dos rins provenientes de dez animais; o número médio de abscessos por rim foi registado, calculando-se novamente a média para obter a média final (±EPM).

Resposta imune à proteína A após infecção estafilocócica ou imunização com SpA_{KKAA}. Após a infecção com *S. aureus* virulento, os ratinhos não desenvolvem imunidade protetora contra a infecção subsequente com a mesma estirpe (Burts *et al.*, 2008) (FIG. 8). A abundância média de IgG específica para SpA-D_{KKAA} nestes animais foi determinada por *dot-blot* como sendo igual a 0,20 µg ml⁻¹ (± 0,04) e 0,14 µg ml⁻¹ (± 0,01) para as estirpes Newman e USA300 LAC, respetivamente (FIG. 4). A concentração mínima de IgG específica para a proteína A, que é necessária para conferir proteção contra a doença em animais vacinados com SpA_{KKAA} ou SpA-D_{KKAA} (P .0,05 redução log₁₀ em UFC estafilocócicas g⁻¹ de tecido renal), foi calculada como sendo igual a 4,05 µg ml⁻¹ (± 0,88). A concentração sérica média de IgG específica para a SpA em voluntários humanos adultos saudáveis (n = 16) foi igual a 0,21 µg ml⁻¹ (± 0,02). Assim, as infecções por *S. aureus* em ratinhos ou nos seres humanos não estão associadas a respostas imunes que produzam níveis significativos de anticorpos neutralizantes dirigidos contra a proteína A, o que provavelmente se deve aos atributos de superantigénio das células B desta molécula. Em contraste, a concentração sérica média de IgG específica para a toxina diftérica em voluntários humanos, 0,068 µg ml⁻¹ (± 0,20), encontrava-se dentro do intervalo para a imunidade protetora contra a difteria (Behring, 1890; Lagergard *et al.*, 1992).

Os isolados clínicos de *S. aureus* expressam a proteína A, um fator de virulência essencial cuja atividade de superantigénio das células B e atributos de evasão face à clearance por opsonofagocitose são absolutamente necessários para a formação dos abscessos estafilocócicos (Palmqvist *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2009; Silverman and Goodyear, 2006). A proteína A pode, pois, ser considerada uma toxina essencial para a patogénese, cujos atributos moleculares têm que ser neutralizados de forma a obter uma imunidade protetora. Ao gerarem variantes não toxigénicas incapazes de se ligar às imunoglobulinas via os domínios Fcγ ou VH₃-Fab, os inventores medem aqui, pela primeira vez, as respostas imunes neutralizantes da proteína A como um correlativo para a imunidade protetora contra a infecção por *S. aureus*. Em contraste com muitas estirpes sensíveis à meticilina, o isolado de CA-MRSA USA300 LAC é significativamente mais virulento (Cheng *et al.*, 2009). Por exemplo, a imunização de animais

experimentais com a proteína de superfície IsdB (Kuklin *et al.*, 2006; Stranger-Jones *et al.*, 2006) produz anticorpos que conferem proteção contra a provocação com *S. aureus* Newman (Stranger-Jones *et al.*, 2009), mas não contra USA300.

MATERIAIS E MÉTODOS

Estirpes bacterianas e crescimento. As estirpes de *Staphylococcus aureus* Newman e USA300 foram crescidas em meio de soja triptica (TSB) a 37 °C. As estirpes de *Escherichia coli* DH5 α e BL21 (DE3) foram crescidas em meio Luria-Bertani (LB) com 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ampicilina a 37 °C.

Anticorpos de coelho. A sequência codificante da SpA foi amplificada por PCR com dois iniciadores, gctgcacatatggcgcaacacgatgaagctcaac (SEQ ID NO:35) e agtggatccttatgcttgagctttgtagcatctgc (SEQ ID NO:36), utilizando ADN molde de *S. aureus* Newman. SpA-D foi amplificado por PCR com dois iniciadores, aacatatgttcaacaagatcaacaagc (SEQ ID NO:38) e aaggatccagattcgtttaatttttagc (SEQ ID NO:39). A sequência de SpA-D_{KKAA} foi mutagenizada com dois conjuntos de iniciadores catatgttcaacaagataaaaaagcgccttctatgaaatc (SEQ ID NO:42) e gatttcatagaaggcgctttttttatctttggttgaacatatg (SEQ ID NO:43) para Q9K, Q10K, bem como cttcattcaaagtcttaaagccgccccaaagcactaac (SEQ ID NO:40) e gttagtgctttggcttggggcgctttaaagactttgaaatgaag (SEQ ID NO:41) para D36A, D37A. A sequência de SpA_{KKAA} foi sintetizada por Integrated DNA Technologies, Inc. Os produtos de PCR foram clonados em pET-15b, produzindo a proteína recombinante com uma marca His₆ N-terminal. Os plasmídeos foram transformados em BL21(DE3). As culturas crescidas durante a noite dos transformantes foram diluídas de 1:100 em meio fresco e crescidas a 37 °C para uma DO₆₀₀ igual a 0,5, altura em que as culturas foram induzidas com isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM e crescidas durante três horas adicionais. As células bacterianas foram sedimentadas por centrifugação, suspensas em tampão da coluna (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM) e quebradas com uma célula de pressão French a 14.000 psi. Os lisados foram libertos de componentes membranares e insolúveis por ultracentrifugação a 40.000 xg. As proteínas no lisado solúvel foram submetidas a cromatografia de afinidade em níquel-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA,

Qiagen). As proteínas foram eluídas em tampão da coluna contendo concentrações sucessivamente mais elevadas de imidazol (100-500 mM). As concentrações de proteína foram determinadas por ensaio com ácido bicinconínico (BCA) (Thermo Scientific). Para a produção de anticorpos, imunizaram-se coelhos (New Zealand brancos, fêmea, com 6 meses de idade, Charles River Laboratories) com 500 µg de proteína emulsionada em adjuvante completo de Freund (Difco) por injeção subcapsular. Para as imunizações de reforço, as proteínas foram emulsionadas em adjuvante incompleto de Freund e injetadas 24 ou 48 dias após a imunização inicial. No dia 60, os coelhos foram sangrados e o soro recuperado.

Isolamento dos anticorpos. O antigénio purificado (5 mg de proteína) foi ligado covalentemente a colunas HiTrap HP ativadas com NHS (GE Healthcare). A matriz contendo o antigénio foi utilizada para a cromatografia de afinidade de 10-20 ml de soro de coelho a 4 °C. A matriz carregada foi lavada com 50 volumes de coluna de PBS, e os anticorpos foram eluídos com tampão de eluição (glicina 1 M, pH 2,5; NaCl 0,5 M) e imediatamente neutralizados com Tris-HCl 1M, pH 8,5. Os anticorpos purificados foram dialisados durante a noite contra PBS a 4 °C.

Fragmentos F(ab)₂. Os anticorpos purificados por afinidade foram misturados com 3 mg de pepsina a 37 °C durante 30 minutos. A reação foi parada com Tris-HCl 1 M, pH 8,5, e os fragmentos F(ab)₂ foram purificados por afinidade com colunas HiTrap HP ativadas com NHS e conjugadas com antigénios específicos. Os anticorpos purificados foram dialisados durante a noite contra PBS a 4 °C, carregados num gel de SDS-PAGE e visualizados mediante coloração com azul de Coomassie.

Imunização ativa e passiva. Imunizaram-se ratinhos BALB/c (3 semanas de idade, fêmea, Charles River Laboratories) com 50 µg de proteína emulsionada em adjuvante completo de Freund (Difco) por injeção intramuscular. Para as imunizações de reforço, as proteínas foram emulsionadas em adjuvante incompleto de Freund e injetadas 11 dias após a imunização inicial. No dia 20 após a imunização, sangraram-se 5 ratinhos para obter os soros para a determinação dos títulos dos

anticorpos específicos por ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA).

Os ratinhos BALB/c foram imunizados por injeção intramuscular e reforçados com o mesmo antigénio em alúmen após 11 e 25 dias. No dia 34, os ratinhos foram sangrados para obter o soro com os títulos de anticorpos específicos. Os anticorpos purificados por afinidade foram injetados na cavidade peritoneal de ratinhos BALB/c, 24 horas ou 4 horas antes da provocação subletal ou letal, respetivamente. O sangue dos animais foi recolhido por punção da veia periorbital e os títulos séricos dos anticorpos específicos foram medidos por ELISA.

Abcesso renal nos ratinhos. Culturas crescidas durante a noite de *S. aureus* Newman ou USA300 (LAC) foram diluídas de 1:100 em meio TSB fresco e crescidas durante 2 horas a 37°C. Os estafilococos foram sedimentados, lavados e suspensos em PBS para uma DO₆₀₀ de 0,4 ($\sim 1 \times 10^8$ UFC ml⁻¹). Os inóculos foram quantificados espalhando alíquotas das amostras em TSA e contando as colónias formadas. Anestesiaram-se ratinhos BALB/c (6 semanas de idade, fêmea, Charles River Laboratories) via injeção intraperitoneal com 100 mg ml⁻¹ de cetamina e 20 mg ml⁻¹ de xilazina por quilograma de peso corporal. Os ratinhos foram infetados por injeção retro-orbital com 1×10^7 UFC de *S. aureus* Newman ou 5×10^6 UFC de *S. aureus* USA300. No dia 4 após a provocação, os ratinhos foram mortos por inalação de CO₂. Removeram-se ambos os rins, e a carga estafilocócica num órgão foi analisada por homogeneização do tecido renal em PBS contendo 1% de Triton X-100. As diluições em série do homogenato foram espalhadas em TSA e incubadas para a formação de colónias. O órgão restante foi examinado por histopatologia. Resumidamente, os rins foram fixados em formalina a 10% durante 24 horas à temperatura ambiente. Os tecidos foram incluídos em parafina, cortados em secções finas, corados com hematoxilina-eosina e visualizados por microscopia ótica para contabilizar os abscessos. Todas as experiências com ratinhos foram efetuadas de acordo com as diretrizes institucionais, após revisão e aprovação do protocolo experimental pelo Comité Institucional de Biossegurança (IBC) e o Comité Institucional de Proteção e Uso de Animais (IACUC) da Universidade de Chicago.

Infeção dos ratinhos. Os estafilococos foram usados para infectar os ratinhos anestesiados por injeção retro-orbital (1×10^7 UFC de *S. aureus* Newman, 5×10^6 UFC de *S. aureus* USA300 ou 3×10^7 UFC de *S. aureus* Mu50). No dia 4, 15 ou 30, os ratinhos foram mortos, os rins removidos e o tecido homogeneizado espalhado em ágar-ágar para a formação de colónias. O tecido do órgão também foi cortado em secções finas, corado com hematoxilina-eosina e observado por microscopia. As experiências com os animais foram efetuadas de acordo com as diretrizes institucionais, após revisão e aprovação do protocolo experimental pelo Comité Institucional de Biossegurança (IBC) e o Comité Institucional de Proteção e Uso de Animais (IACUC) da Universidade de Chicago.

Para as experiências de provocação letal, os ratinhos BALB/c (coortes de 8-10 animais por experiência) foram injetados com uma suspensão de $2-6 \times 10^8$ UFC de *S. aureus* Newman ou da sua variante Δ spa isogénica na cavidade peritoneal. A sobrevivência dos animais foi monitorizada ao longo de um período de 15 dias, e a significância estatística dos dados de sobrevivência foi analisada com o teste log-rank.

Ligação da proteína A. Para a ligação à IgG humana, as colunas de afinidade Ni-NTA foram pré-carregadas com 200 μ g das proteínas purificadas (SpA, SpA-D, SpA-D_{KKAA} e SrtA) em tampão da coluna. Após lavagem, carregaram-se 200 μ g de IgG humana (Sigma) na coluna. Recolheram-se amostras de proteína das lavagens e das eluições e submeteram-se a eletroforese em gel SDS-PAGE, seguida de coloração com azul de Coomassie. As proteínas purificadas (SpA, SpA_{KKAA}, SpA-D e SpA-D_{KKAA}) em tampão carbonato 0,1 M (pH 9,5) foram aplicadas sobre placas de ELISA MaxiSorp (NUNC), numa concentração de 1 μ g ml⁻¹, durante a noite a 4 °C. Em seguida, as placas foram bloqueadas com leite gordo a 5%, seguida de incubação com diluições em série de IgG humana ou fragmentos Fc ou F(ab)₂ humanos conjugados com peroxidase durante uma hora. As placas foram lavadas e desenvolvidas usando os reagentes de ELISA OptEIA (BD). As reações foram paradas com ácido fosfórico 1 M, e as leituras da A₄₅₀ foram usadas para calcular a metade do título máximo e a percentagem de ligação.

Ensaio de ligação ao fator de von Willebrand (vWF). As proteínas purificadas (SpA, SpA_{KKAA}, SpA-D e SpA-D_{KKAA}) foram aplicadas nas placas e bloqueadas da forma descrita acima. As placas foram incubadas com vWF humano, numa concentração de 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$, durante duas horas e depois foram lavadas e bloqueadas com IgG humana durante outra hora. Após lavagem, as placas foram incubadas com diluições em série de um anticorpo conjugado com peroxidase dirigido contra o vWF humano durante uma hora. As placas foram lavadas e desenvolvidas usando os reagentes de ELISA OptEIA (BD). As reações foram paradas com ácido fosfórico 1 M, e as leituras da A₄₅₀ foram usadas para calcular a metade do título máximo e a percentagem de ligação. Para os ensaios de inibição, as placas foram incubadas com fragmentos F(ab)₂ purificados por afinidade e específicos para SpA-D_{KKAA}, numa concentração de 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$, durante uma hora antes dos ensaios de ligação ao ligando.

Apoptose de esplenócitos. As proteínas purificadas por afinidade (150 μg de SpA, SpA-D, SpA_{KKAA} e SpA-D_{KKAA}) foram injetadas na cavidade peritoneal de ratinhos BALB/c (6 semanas de idade, fêmea, Charles River Laboratories). Quatro horas após a injeção, os animais foram mortos por inalação de CO₂. Os seus baços foram removidos e homogeneizados. Os resíduos celulares foram removidos utilizando um coador de células, e as células suspensas foram transferidas para tampão de lise ACK (NH₄Cl 0,15 M; KHCO₃ 10 mM; EDTA 0,1 mM) para lisar os glóbulos vermelhos. Os glóbulos brancos foram sedimentados por centrifugação, suspensos em PBS e corados com anticorpo monoclonal anti-CD19 conjugado com R-PE (Invitrogen), diluído de 1:250, em gelo e no escuro durante uma hora. As células foram lavadas com FBS a 1% e fixadas em formalina a 4% durante a noite a 4 °C. No dia seguinte, as células foram diluídas em PBS e analisadas por citometria de fluxo. O órgão restante foi examinado por histopatologia. Resumidamente, os baços foram fixados em formalina a 10% durante 24 horas à temperatura ambiente. Os tecidos foram incluídos em parafina, cortados em secções finas, corados com o kit de deteção de apoptose (Millipore) e inspecionados por microscopia ótica

Quantificação de anticorpos. Os soros foram recolhidos de voluntários humanos saudáveis ou de ratinhos BALB/c que haviam sido infetados com *S. aureus* Newman ou USA300 durante 30 dias

ou que haviam sido imunizados com SpA-D_{KKAA}/SpA_{KKAA} da forma descrita acima. As proteínas IgG humana/ratinho (Jackson Immunology Laboratory), SpA_{KKAA} e CRM₁₉₇ foram transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas com leite gordo a 5%, seguida de incubação com soro humano ou soro de ratinho. Um anticorpo anti-IgG humana/ratinho purificado por afinidade e conjugado com IRDye 700DX (Rockland) foi utilizado para quantificar as intensidades do sinal, utilizando o sistema de imagens de infravermelho Odyssey™ (Licor). As experiências com sangue de voluntários humanos envolveram protocolos que foram revistos, aprovados e executados sob supervisão regulatória do Conselho Institucional de Avaliação (IRB) da Universidade de Chicago.

Análise estatística. Os testes *t* de Student bicaudais foram efetuados para analisar a significância estatística dos dados de abscessos renais, ELISA e superantigénio das células B. Os dados de sobrevivência animal foram analisados com o teste log-rank (Prism).

EXEMPLO 3

AS COAGULASES DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* CONTRIBUEM PARA A FORMAÇÃO DE ABCESSOS E FUNCIONAM COMO ANTIGÉNIOS PROTETORES

Todos os isolados clínicos de *S. aureus* apresentam atividade de coagulase - a coagulação do sangue ou plasma através da ativação não proteolítica da protrombina para clivar o fibrinogénio. Os inventores identificaram a protrombina, o fibrinogénio, a coagulase (Coa) e a proteína de ligação ao fator de von Willebrand (vWbp) nas lesões de abscessos estafilocócicos de ratinhos infetados. As proteínas Coa e vWbp segregadas contribuíram ambas para a atividade de coagulase de *S. aureus* Newman, permitindo desse modo a formação de abscessos, assim como a doença letal nos ratinhos. Os anticorpos produzidos contra as proteínas Coa ou vWbp purificadas bloqueiam especificamente a associação do polipéptido correspondente à protrombina e ao fibrinogénio. Os anticorpos específicos para Coa e vWbp, quer produzidos por imunização ativa quer por imunização passiva, preveniram a formação de abscessos e a mortalidade dos ratinhos infetados com estafilococos.

VIII. Resultados

Localização da coagulase e dos fatores de coagulação nos abscessos estafilocócicos. Os trabalhos anteriores estabeleceram o modelo de abscesso renal no ratinho, segundo o qual 1×10^7 UFC do isolado clínico humano *S. aureus* Newman (Baba *et al.*, 2007) são injetados na corrente sanguínea de ratinhos BALB/c (Albus *et al.*, 1991). Quarenta e oito horas após a infecção, os ratinhos desenvolvem abscessos disseminados em múltiplos órgãos, detetáveis por microscopia ótica do tecido renal finamente seccionado e corado com hematoxilina-eosina, inicialmente como uma acumulação de leucócitos polimorfonucleares (PMN) com poucas bactérias (Cheng *et al.*, 2009). Ao dia 5 da infecção, os abscessos aumentam de tamanho e delimitam uma população central de estafilococos (comunidade do abscesso estafilocócico - SAC), rodeada por uma camada de material eosinofílico amorfo (a pseudocápsula) e um anel grande de PMN (Cheng *et al.*, 2009). A histopatologia revela a existência de necrose massiva dos PMN na proximidade do nidus estafilocócico, no centro do abscesso, bem como de um manto de fagócitos saudáveis. Em intervalos de tempo posteriores, as SAC aumentam e os abscessos rompem-se, libertando material necrótico e estafilococos na corrente sanguínea. Tem início um novo ciclo de formação de abscessos, que acaba por precipitar um resultado letal das infeções (Cheng *et al.*, 2009).

Para localizar as coagulases nas lesões do abscesso, os rins de ratinhos que haviam sido infetados durante 5 dias com *S. aureus* Newman foram finamente seccionados e corados por imuno-histoquímica com anticorpos de coelho específicos para Coa ou vWbp purificados por afinidade (FIG. 10). Os inventores observaram uma coloração intensa da Coa na pseudocápsula que rodeia as SAC e na periferia das lesões do abscesso, isto é, a cápsula de fibrina que faz fronteira com o tecido não infetado. A coloração da proteína vWbp verificou-se por todo o abscesso, mas também com acumulação na periferia. Os anticorpos específicos para a protrombina revelaram uma coloração do zimogénio na pseudocápsula e na periferia, ao passo que a coloração específica do fibrinogénio/fibrina ocorreu por todo o abscesso. No seu conjunto, estes resultados indicam que a pseudocápsula eosinofílica dos abscessos estafilocócicos alberga protrombina e fibrinogénio, que se colocalizam com a

Coa. Na periferia dos abscessos, a Coa, a vWbp, a protrombina e o fibrinogénio/fibrina estão colocalizados. Estas observações instigaram uma investigação adicional sobre se as proteínas Coa e vWbp serão ou não contribuintes cruciais para o estabelecimento dos abscessos, ao desencadarem a conversão do fibrinogénio em fibrina mediada pela protrombina.

Coa e vWbp de *Staphylococcus aureus* contribuem para a coagulação do sangue de ratinho. Os genes *coa* e/ou *vWbp* no cromossoma de *S. aureus* Newman foram eliminados por substituição alélica utilizando tecnologia pKOR1 (Bae and Schneewind, 2005). Construíram-se dois plasmídeos de complementação, *pcoa* e *pvWbp*, através da clonagem dos genes estruturais *coa* ou *vWbp*, assim como das suas sequências promotoras a montante, em pOS1 (Schneewind *et al.*, 1993). Os plasmídeos foram introduzidos nos estafilococos por eletroporação e a sua replicação continuada foi selecionada em meio suplementado com cloranfenicol (Schneewind *et al.*, 1992). Quando foram investigadas quanto à presença das coagulases com anticorpos específicos, os inventores observaram a secreção de Coa pela estirpe de tipo selvagem, bem como pela estirpe $\Delta vWbp$, mas não pelas variantes Δcoa ou $\Delta coa/\Delta vWbp$ (FIG. 11). O defeito fenotípico dos mutantes Δcoa e $\Delta coa/\Delta vWbp$ foi reconstituído pela electroporação com *pcoa*, mas não por *pvWbp* (FIG. 11). De forma idêntica, a secreção de vWbp foi observada nas culturas de *S. aureus* Newman (tipo selvagem) bem como dos mutantes Δcoa , mas não nas variantes $\Delta vWbp$ ou $\Delta coa/\Delta vWbp$ (FIG. 11). Este defeito foi reconstituído pela eletroporação com *pvWbp*, mas não por *pcoa*.

A coagulação do sangue é inibida eficazmente pela hirudina (lepirudina) (Harvey *et al.*, 1986), um péptido de 65 resíduos de sanguessuga que forma um complexo 1:1 com a trombina, bloqueando deste modo a conversão proteolítica do fibrinogénio em fibrina (Markwardt, 1955). A inoculação de sangue fresco de ratinho tratado com lepirudina com *S. aureus* Newman desencadeou a coagulação em menos de 12 horas, ao passo que o sangue infetado de forma simulada permaneceu sem coágulos durante mais de 48 horas (FIG. 11C). Utilizando este ensaio, observou-se que as variantes estafilocócicas desprovidas de atividade de coagulase apresentaram atrasos no tempo de coagulação: Δcoa 36 horas e $\Delta vWbp$ 24 horas (FIG. 11C). O mutante duplo,

$\Delta coa/\Delta vWbp$, não conseguiu coagular o sangue de ratinho. Estes defeitos foram complementados por eletroporação com os plasmídeos $pvWbp$ e $pcoa$. Em conjunto, estes resultados indicam que as duas coagulases, Coa e $vWbp$, contribuem para a capacidade de *S. aureus* Newman de coagular o sangue de ratinho (FIG. 11C).

Coa e $vWbp$ são necessárias para a sobrevivência dos estafilococos no sangue, a formação de abscessos e a bacteriemia letal em ratinhos. Para analisar as contribuições das coagulases para a virulência, os inventores examinaram primeiro a sobrevivência dos estafilococos no sangue tratado com lepirudina. A estirpe *S. aureus* Newman de tipo selvagem não foi morta no sangue de ratinho. Contudo, as variantes isogênicas desprovidas de Coa , isto é, Δcoa e $\Delta coa/\Delta vWbp$, apresentaram ambas uma redução significativa de UFC após 30 minutos de incubação. Este defeito de sobrevivência foi restabelecido por $pcoa$, mas não por $pvWbp$, sugerindo que apenas a Coa é necessária para a sobrevivência dos estafilococos no sangue de ratinho.

A bacteriemia estafilocócica é uma causa frequente de mortalidade humana em ambientes hospitalares (Klevens *et al.*, 2007). Os inventores tentaram comprovar se as coagulases são ou não necessárias para a provocação letal de ratinhos BALB/c, após injeção intravenosa de 1×10^8 UFC de *S. aureus* Newman. Todos os animais infetados com a estirpe parental Newman de tipo selvagem sucumbiram à infecção no espaço de 24 horas (FIG. 12B). Os animais infetados com os mutantes simples, Δcoa ou $\Delta vWbp$, apresentaram todos uma extensão curta, embora estatisticamente significativo, do tempo até à morte (FIG. 12B). O mutante duplo estava significativamente mais incapacitado que os mutantes com as deleções únicas, e os animais infetados com a estirpe $\Delta coa/\Delta vWbp$ apresentaram a maior redução na virulência em comparação com o tipo selvagem (FIG. 12B).

Em seguida, os inventores analisaram a formação de abscessos nos tecidos renais dos ratinhos infetados e observaram que as variantes Δcoa estavam debilitadas em termos da sua capacidade para formar abscessos no dia 5 e 15 da infecção (Tabela 7, FIG. 12G, 12I). O mutante $\Delta vWbp$ continuou a formar

abcessos, embora a carga bacteriana, o tamanho global das comunidades do abcesso estafilocócico e a quantidade de infiltrados de células imunes tenham sido reduzidos nestas variantes (Tabela 7, FIG. 12D, 12F). Os mutantes da coagulase estão ligeiramente mais atenuados em termos de virulência que os mutantes da vWbp, uma vez que a estirpe Δ coa apresenta menor formação de abcessos e menor carga bacteriana no dia 15. Contudo, os mutantes duplos Δ coa/ Δ vWbp estão marcadamente incapacitados em termos da sua capacidade para formar abcessos e persistem nos tecidos infetados (Tabela 7, FIG. 12H, 12K). Assim, tanto a coagulase como a proteína de ligação ao fator de von Willebrand são importantes para a sobrevivência estafilocócica no hospedeiro, seja na corrente sanguínea ou nos tecidos do órgão final.

Tabela 7. Virulência de mutantes *coa*, *vWbp* e *coa/vWbp* de *S. aureus* Newman

Estripe	Carga estafilocócica no tecido renal*			Formação de abscessos no tecido renal*		
	^a Log ₁₀ UFC g ⁻¹ de tecido renal	^b Significância (valor P)	^c Redução em log ₁₀ UFC g ⁻¹	^d Abcessos à superfície (%)	^e Número de abscessos por rim	^f Significância (valor P)
Análise da carga estafilocócica e da formação de abscessos no dia 5						
PBS	6,034 ± 0,899	-	-	75	2,333 ± 0,623	-
Coa	5,538 ± 0,560	0,3750	0,492	38	1,111 ± 0,389	0,1635
<i>vWbp</i>	5,247 ± 0,311	0,0859	0,783	56	1,750 ± 0,650	0,6085
<i>coa/vWbp</i>	4,908 ± 0,251	0,0044	1,395	25	0,750 ± 0,342	0,0786
Análise da carga estafilocócica e da formação de abscessos no dia 15						
PBS	5,380 ± 0,294	-	-	81	3,000 ± 1,234	-
Coa	4,023 ± 0,324	0,0077	1,357	44	1,400 ± 0,452	0,1862
<i>vWbp</i>	5,140 ± 0,689	0,0688	0,240	50	1,625 ± 0,238	0,2974
<i>coa/vWbp</i>	3,300 ± 0,552	0,0056	2,080	20	0,556 ± 0,154	0,0341

*Os ratinhos BALB/c (n=18-20) foram injetados no peritônio com 100 µl de anticorpos de coelho purificados por afinidade contra *vWbp* (α -*vWbp*), Coa (α -Coa) ou *vWbp* e Coa (α -*vWbp*/Coa) no dia 0. Vinte e quatro horas mais tarde, os animais foram examinados quanto aos títulos do anticorpo IgG no soro e foram provocados por inoculação intravenosa com 1×10⁷ unidades formadoras de colônias (UFC) de *S. aureus* Newman ou respetivos mutantes. Cinco ou quinze dias depois, os animais foram mortos e ambos os rins removidos. Um rim foi fixado em formaldeído, incluído em parafina, cortado em secções finas e corado com hematoxilina-eosina, analisando-se quatro secções sagitais por rim quanto à formação de abscessos. O outro rim foi homogeneizado em tampão PBS, o homogenato foi espalhado para a formação de colônias e a carga estafilocócica foi contabilizada como UFC.

^aMédia da carga estafilocócica, calculada como log₁₀ UFC g⁻¹, em tecidos renais homogeneizados, 4 dias após a infeção em coortes de dezoito a vinte ratinhos BALB/c por imunização. O erro padrão da média (\pm EPM) está indicado.

^bA significância estatística foi calculada com o teste t de Student desemparelhado bicaudal e os valores P foram registados; os valores P <0,05 foram considerados significativos.

^cRedução da carga bacteriana calculada como log₁₀ UFC g⁻¹.

^dA formação de abscessos em tecidos renais, quatro dias após a infeção, foi medida por inspeção macroscópica (% positiva).

^eHistopatologia de secções finas, coradas com hematoxilina-eosina, dos rins provenientes de dez animais; o número médio de abscessos por rim foi registado, calculando-se novamente a média para obter a média final (\pm EPM).

^fA significância estatística foi calculada com o teste t de Student desemparelhado bicaudal e os valores P foram registados; os valores P <0,05 foram considerados significativos.

Anticorpos contra as coagulases e o seu efeito na coagulação do sangue induzida durante a infeção por estafilococos. As proteínas His₆-Coa e His₆-vWbp recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade em Ni-NTA (FIG. 13A), emulsionadas em adjuvante e injetadas em coelhos para produzir anticorpos específicos, que foram purificados em matrizes de afinidade contendo a proteína recombinante. Os anticorpos dirigidos contra Coa ligaram-se preferencialmente a Coa e não a vWbp (FIG. 13B). O recíproco foi verdadeiro para os anticorpos dirigidos contra vWbp (FIG. 13B). Quando foram adicionados ao sangue de ratinho tratado com lepirudina e infetado com *S. aureus* Newman, os inventores observaram que cada um dos anticorpos dirigidos contra Coa, vWbp ou Coa e vWbp bloqueou a coagulação do sangue (FIG. 13C). Como controlos, as amostras tratadas de forma simulada ou com o anticorpo V10 irrelevante (que fornece proteção contra a injeção de *Yersinia pestis* tipo III (DeBord *et al.*, 2006)) não tiveram nenhum efeito (FIG. 13C).

Para examinar o papel dos anticorpos sobre a proteína Coa ou vWbp isolada, os inventores purificaram as proteínas recombinantes funcionalmente ativas (Friedrich *et al.*, 2003), que foram depois adicionadas a sangue de ratinho tratado com lepirudina. O sangue de ratinho tratado com Coa ou vWbp coagulou em menos de 30 minutos (FIG. 13D). Como controlo, a simulação (PBS) ou o tratamento com o anticorpo V10 irrelevante não afetaram a coagulação. Os anticorpos dirigidos contra Coa ou vWbp atrasaram a coagulação do sangue de ratinho tratado com as proteínas recombinantes e isto verificou-se mesmo para o fator homólogo cruzado (FIG. 13D). Observou-se uma reatividade cruzada mínima dos anticorpos por ELISA e transferência de Western, mas existe uma inibição cruzada da função.

Anticorpos que bloqueiam a associação entre as coagulases e a protrombina ou o fibrinogénio. A ressonância de plasma de superfície (SPR do inglês *surface plasmon resonance*) foi utilizada para investigar a forma como os anticorpos α Coa e α vWbp interferem com as funções fisiológicas das coagulases. A protrombina foi imobilizada num chip CM5. Fazendo fluir Coa purificada sobre a amostra, calculou-se uma constante de dissociação K_D de 28 nM, uma medida que é proporcional a outros

valores referidos na literatura (Friedrich *et al.*, 2003). A adição de α Coa levou a uma diminuição dependente da concentração do sinal de resposta para a formação do complexo protrombina·Coa, indicando que estes anticorpos bloqueiam a associação da Coa com a protrombina (FIG. 14A). A SPR confirmou adicionalmente a associação entre a coagulase e o fibrinogénio ($K_D = 93,1$ nM; FIG. 14B). Com a pré-incubação com α Coa, os inventores observaram uma diminuição dramática da ligação da Coa ao fibrinogénio (FIG. 14B). No seu conjunto, estes resultados indicam que os anticorpos dirigidos contra a Coa bloqueiam a associação desta molécula com os fatores de coagulação do sangue.

A vWbp purificada apresentou uma forte afinidade para a protrombina ($K_D = 38,4$ nM; FIG. 13C) e o fibrinogénio (484 nM; FIG. 13D), sendo que esta última não havia sido reconhecida até ao momento (Kroh *et al.*, 2009). Além disso, a pré-incubação com anticorpos gerados contra vWbp bloqueou a associação entre a vWbp e a protrombina ou o fibrinogénio de uma forma dose-dependente (FIG. 13C, 13D). Estas constatações apoiam os resultados dos ensaios de coagulação sanguínea, demonstrando que anticorpos policlonais específicos podem bloquear a interação entre a Coa ou a vWbp e componentes específicos da cascata de coagulação (FIG. 12).

Para testar se os anticorpos específicos para as coagulases bloqueiam a conversão do fibrinogénio em fibrina, mediu-se a capacidade dos complexos protrombina·coagulase para clivar S-2238, um substituto para a clivagem do fibrinogénio em fibrina (FIG. 14E, 14F). A adição de anticorpos específicos a protrombina·Coa ou protrombina·vWbp reduziu a capacidade destes complexos para converter o substrato em produto. Além disso, observou-se uma inibição cruzada dos anticorpos específicos para as coagulases, em que a adição de anticorpos cruzados provocou uma redução da atividade do complexo protrombina·vWbp. Estes resultados sugerem que os anticorpos específicos dirigidos contra Coa ou vWbp neutralizam o efeito patofisiológico do produto segregado ao qual se ligam.

Os anticorpos contra as coagulases conferem proteção contra a doença estafilocócica. Os anticorpos do tipo IgG específicos para a Coa ou a vWbp foram isolados a partir do

soro de coelho por cromatografia numa coluna de afinidade, produzida através da reticulação covalente do antigénio a Sepharose ativada por CNBr. Os inventores tentaram perturbar a patogénese estafilocócica através da administração de anticorpos neutralizantes dirigidos contra Coa e/ou vWbp. Os ratinhos receberam os anticorpos de coelho e foram provocados com uma dose letal da estirpe *S. aureus* Newman. A injeção dos anticorpos específicos para Coa ou vWbp prolongou significativamente a sobrevivência murina (FIG. 15).

Para testar os anticorpos relativamente a uma possível proteção vacinal contra a bacteriemia letal, os anticorpos IgG purificados por afinidade (5 mg kg^{-1} peso corporal) foram injetados na cavidade peritoneal de ratinhos. Vinte e quatro horas depois, os animais foram injetados com uma suspensão de 1×10^8 UFC de *S. aureus* Newman em PBS, no plexo retro-orbital. Monitorizando os animais ao longo do tempo, os inventores observaram que os anticorpos dirigidos contra vWbp (α vWbp) conduziram a um aumento do tempo até à morte e a uma sobrevivência de 10%, em comparação com os animais que tinham recebido os anticorpos α V10 irrelevantes e morrido no espaço de 12-48 horas (FIG. 15). Os anticorpos contra Coa (α Coa) aumentaram ainda mais o tempo até à morte dos ratinhos imunizados passivamente (FIG. 15). Uma mistura de ambos os anticorpos (α Coa/ α vWbp) não produziu uma melhoria estatisticamente significativa da sobrevivência ou do tempo até à morte em relação aos anticorpos α Coa.

Para examinar a imunização passiva em termos de proteção contra a formação de abscessos estafilocócicos, os anticorpos purificados (5 mg kg^{-1} peso corporal) foram injetados na cavidade peritoneal de ratinhos, e a formação de abscessos foi monitorizada durante cinco dias após provocação intravenosa com 1×10^7 UFC de *S. aureus* Newman. Os anticorpos contra vWbp não conduziram a uma redução significativa da carga estafilocócica ou do número de lesões inflamatórias (Tabela 8), embora as lesões observadas albergassem comunidades do abscesso mais pequenas e infiltrados de PMN reduzidos em comparação com os ratinhos imunizados de forma simulada (FIG. 16). Os anticorpos contra a coagulase reduziram a carga estafilocócica ($P=0,042$), assim como o número de lesões inflamatórias ($P=0,039$); não foram detetadas lesões de abscesso

com comunidades estafilocócicas no nidus de grandes infiltrados de PMN (FIG. 16 e Tabela 8). Os animais que receberam ambos os anticorpos, α Wbp e α Coa, apresentaram uma redução ainda maior da carga estafilocócica ($P=0,013$) e uma redução na abundância de lesões inflamatórias ($P=0,0078$) (Tabela 8). Em conjunto, estes resultados indicam que os anticorpos contra as coagulases, administrados por imunização passiva, protegem os ratinhos contra a formação de abscessos e permitem a clearance do organismo patogénico invasor dos tecidos do hospedeiro. Os anticorpos contra vWbp contribuem relativamente pouco para a proteção vacinal, o que está de acordo com a constatação de que a vWbp não desempenha o mesmo papel crítico que a Coa durante a patogénese das infeções por *S. aureus* em ratinhos (Tabela 8).

Tabela 8. Imunização passiva de ratinhos com anticorpos de coelho contra Coa e/ou vWbp

Anticorpo de coelho purificado	Carga estafilocócica no tecido renal*				Formação de abscessos no tecido renal*		
	^a log ₁₀ UFC g ⁻¹ de tecido renal	^b Significância (Valor P)	^c Redução em ^a log ₁₀ UFC g ⁻¹	^d Título de IgG	^e Abcessos à superfície (%)	^f Número de abscessos por rim	^g Significância (Valor P)
Simulação	5,86 ± 0,29	-	-	<100	75	4,6 ± 1,4	-
α-vWbp	5,25 ± 0,36	0,3554	0,60	1100 ± 200	39	1,4 ± 0,5	0,0592
α-Coa	4,68 ± 0,47	0,0420	1,18	1300 ± 250	20	1,2 ± 0,7	0,0396
α-vWbp/Coa	4,29 ± 0,52	0,0130	1,53	1000 ± 300	25	0,3 ± 0,2	0,0078

*Os ratinhos BALB/c (n=18-20) foram injetados no peritônio com 100 µl de anticorpos de coelho purificados por afinidade contra vWbp (α-vWbp), Coa (α-Coa) ou vWbp e Coa (α-vWbp/Coa) no dia 0. Vinte e quatro horas mais tarde, os animais foram examinados quanto aos títulos do anticorpo IgG no soro e foram provocados por inoculação intravenosa com 1x10⁷ unidades formadoras de colônias (UFC) de *S. aureus* Newman. Cinco dias depois, os animais foram mortos e ambos os rins removidos. Um rim foi fixado em formaldeído, incluído em parafina, cortado em seções finas e corado com hematoxilina-eosina, analisando-se quatro seções sagitais por rim quanto à formação de abscessos. O outro rim foi homogeneizado em tampão PBS, o homogenato foi espalhado em meio agarizado para a formação de colônias e a carga estafilocócica foi contabilizada como UFC.

^aMédia da carga estafilocócica, calculada como log₁₀ UFC g⁻¹, em tecidos renais homogeneizados, 4 dias após a infeção em coortes de dezoito a vinte ratinhos BALB/c por imunização. O erro padrão da média (±EPM) está indicado.

^bA significância estatística foi calculada com o teste t de Student desemparelhado bicaudal e os valores P foram registados; os valores P <0,05 foram considerados significativos.

^cRedução da carga bacteriana calculada como log₁₀ UFC g⁻¹.

^dA formação de abscessos em tecidos renais, quatro dias após a infeção, foi medida por inspeção macroscópica (% positiva).

^eHistopatologia de seções finas, coradas com hematoxilina-eosina, dos rins provenientes de dez animais; o número médio de abscessos por rim foi registado, calculando-se novamente a média para obter a média final (±EPM).

^fA significância estatística foi calculada com o teste t de Student desemparelhado bicaudal e os valores P foram registados; os valores P <0,05 foram considerados significativos.

As coagulases funcionam como antigénios protetores para as infeções por estafilococos. As proteínas CoA e vWbp com uma marca de poli-histidina foram purificadas a partir de *E. coli* e usadas como antigénios de vacinas subunitárias. As proteínas (100 µg emulsionadas em CFA ou IFA) foram injetadas em ratinhos BALB/c naíve no dia 0 (CFA) ou no dia 11 (IFA). Os animais foram provocados no dia 21 por inoculação intravenosa de *S. aureus* Newman. Cinco animais de controlo foram sangrados no momento da provocação e os títulos dos anticorpos séricos contra os antigénios vacinais foram determinados por ELISA (Tabela 9). Os animais foram mortos cinco ou quinze dias após a provocação e a carga estafilocócica e a histopatologia das lesões dos abscessos foram analisadas. A imunização com Coa reduziu a carga bacteriana no dia 5 ($P=0,03$; simulação PBS versus Coa) e no dia 15 ($P=4,286 \times 10^{-5}$; simulação PBS versus Coa, ver Tabela 9). A vacinação com Coa também diminuiu o número de lesões infecciosas que se formaram nos tecidos renais, simulação versus Coa, $P=0,03$ (dia 5) e $P=0,0522$ (dia 15) (Tabela 9). É de salientar que nenhum dos ratinhos imunizados com Coa desenvolveu as lesões de abscessos típicas (FIG. 17). Ocasionalmente, observaram-se pequenas acumulações de PMN que não estavam associadas às comunidades do abscesso estafilocócico (FIG. 17). A imunização com vWbp não reduziu significativamente a carga estafilocócica no dia 5 ($P=0,39$; simulação PBS versus vWbp) nem no dia 15 ($P=0,09$; simulação PBS versus vWbp). O número total de lesões inflamatórias não foi reduzido. No entanto, a arquitetura dos abscessos mudou após a imunização com vWbp. Não foram detetadas comunidades estafilocócicas no centro dos abscessos e em vez delas observaram-se infiltrações de PMN (FIG. 17). A vacina de combinação, vWbp-Coa, reduziu adicionalmente o número de células inflamatórias nos tecidos renais e os animais infetados não apresentaram lesões de abscessos no dia 5 nem no dia 15 (Tabela 9).

Tabela 9. Imunização ativa de ratinhos com Coa e/ou vWbp

Antígeno vacinal purificado	log ₁₀ UFC g ⁻¹ de tecido renal	Carga estafilocócica no tecido renal*		Redução em log ₁₀ UFC g ⁻¹	Formação de abscessos no tecido renal*			
		log ₁₀ UFC g ⁻¹ de tecido renal	P		Significância (Valor P)	Abcessos à superfície (%)	Abcessos à superfície (%)	Significância (Valor P)
<i>Dia 5^a</i>								
Simulação	5,75 ± 0,42	-	-	-	<100	56	1,3 ± 0,3	-
vWbp	4,94 ± 0,46	0,1413	0,81	0,81	14000 ± 5000	45	1,8 ± 0,5	0,39
Coa	4,86 ± 0,50	0,1417	0,88	0,88	19000 ± 4000	25	0,3 ± 0,3	0,03
vWbp/Coa	4,84 ± 0,38	0,1195	0,90	0,90	7000 ± 1500	25	0,3 ± 0,3	0,03
<i>Dia 15^a</i>								
Simulação	6,68 ± 0,22	-	-	-	<100	75	6,0 ± 1,9	-
vWbp	3,41 ± 0,47	0,4503	3,27	3,27	14000 ± 5000	20	1,8 ± 1,1	0,09
Coa	3,43 ± 0,54	0,1681	3,25	3,25	19000 ± 4000	20	1,2 ± 0,8	0,05
vWbp/Coa	3,79 ± 0,37	0,0263	2,89	2,89	7000 ± 1500	30	0,7 ± 0,5	0,01

*Os ratinhos BALB/c (n=18-20) foram injetados com 100 µg de vWbp, Coa ou vWbp e Coa emulsionadas em CFA no dia 0 e reforçados com o mesmo antígeno emulsionado em IFA no dia 11. No dia 20, os animais foram examinados quanto aos títulos do antígeno IFA e, no dia 21, foram provocados por inoculação intravenosa com 1×10⁷ unidades formadoras de colônias (UFC) de *S. aureus* Newman. No dia 25, os animais foram mortos e ambos os rins removidos. Um rim foi fixado em formaldeído, incluído em parafina, cortado em secções finas e corado com hematoxilina-eosina, analisando-se quatro secções sagitais por rim quanto à formação de abscessos. O outro rim foi homogeneizado em tampão PBS, o homogenato foi espalhado em meio agarizado para a formação de colônias e a carga estafilocócica foi contabilizada como UFC.

*Média da carga estafilocócica, calculada como log₁₀ UFC g⁻¹, em tecidos renais homogeneizados, 4 dias após a infecção em cortes de dezolito a vinte ratinhos BALB/c por imunização. O erro padrão da média (±EPM) está indicado.

*A significância estatística foi calculada com o teste t de Student desemparelhado bicaudal e os valores P foram registrados; os valores P <0,05 foram considerados significativos.

*Redução da carga bacteriana calculada como log₁₀ UFC g⁻¹.

*Média de cinco títulos de IgG sérica escolhidos aleatoriamente, que foram medidos por ELISA com o antígeno SpA-D_{max} antes da infecção estafilocócica.

*A formação de abscessos em tecidos renais, quatro dias após a infecção, foi medida por inspeção macroscópica (% positiva).

*Histopatologia de secções finas, coradas com hematoxilina-eosina, dos rins provenientes de dez animais; o número médio de abscessos por rim foi registrado, calculando-se novamente a média para obter a média final (±EPM).

*A significância estatística foi calculada com o teste t de Student desemparelhado bicaudal e os valores P foram registrados; os valores P <0,05 foram considerados significativos.

*Análise dos ratinhos 5 dias após a infecção com *S. aureus* Newman.

*Análise dos ratinhos 15 dias após a infecção com *S. aureus* Newman.

IX. Materiais e métodos

Estirpes bacterianas e crescimento de culturas. Os estafilococos foram crescidos em meio de soja tríptica líquido ou agarizado a 37 °C. As estirpes de *E. coli* DH5 α e BL21 (DE3) (Studier *et al.*, 1990) foram crescidas em meio Luria líquido ou agarizado a 37 °C. Utilizou-se ampicilina (100 μ g/ml) e cloranfenicol (10 μ g/ml) para a seleção dos plasmídeos pET15b (Studier *et al.*, 1990) e pOS1 (Schneewind *et al.*, 1993), respectivamente.

Produção de mutantes. As sequências de ADN 1kb a montante e a jusante de *coa* e *vWbp* foram amplificadas por PCR utilizando os iniciadores attB1_Coa, Coa1_BamHI, Coa2_BamHI, attbB2_Coa e attB1_vWF, vWF1_BamHI, vWF2_BamHI, attbB2_vWF (Tabela 10). Os fragmentos foram introduzidos em pKOR1 utilizando o kit BP clonase II (Invitrogen) (Bae and Schneewind, 2005). Estes vetores foram introduzidos em *S. aureus* Newman por eletroporação e submetidos a troca alélica induzida por deslocamento da temperatura para gerar a deleção correspondente (Bae and Schneewind, 2005). Os mutantes foram comprovados através de amplificação por PCR do locus do gene, sequenciação do ADN e análise de imunotransferência.

Para gerar os plasmídeos de complementação, desenharam-se os iniciadores Coa_promoter_BamHI_F, Coa_out_PstI_R, vWbp_promoter_BamHI_F e vWbp_out_PstI_R (Tabela 10) para incluir a região promotora a montante de *vWbp* ou *coa* e as regiões amplificadas foram clonadas em pOS1. Estes plasmídeos foram verificados por sequenciação e depois foram introduzidos nas estirpes de estafilococos por eletroporação. Para a análise de imunotransferência, as culturas de estafilococos crescidas durante a noite em meio de soja tríptica (Difco) foram renovadas (1:100) e crescidas com agitação a 37 °C até atingirem uma DO₆₀₀ de 0,4. Centrifugaram-se amostras de um ml de cada cultura a 13.000 xg, durante 10 minutos numa centrífuga de bancada, e recuperou-se o sobrenadante. Adicionaram-se 75 μ l de uma solução de ácido tricloroacético a 100% (p/v) e incubaram-se as amostras em gelo durante 10 minutos, seguida de centrifugação e lavagem com 1 ml de acetona a 100% gelada. As amostras foram secas ao ar durante a noite e solubilizadas

em 50 µl de tampão de amostra (4% SDS, Tris-HCl 50 mM, pH 8; 10% glicerol e azul de bromofenol).

Ensaio de sobrevivência no sangue e coagulação sanguínea.

As culturas das estirpes de estafilococos crescidas durante a noite foram diluídas de 1:100 em meio TSB fresco e crescidas a 37 °C até atingirem uma DO_{600} de 0,4. Centrifugou-se um ml da cultura, e os estafilococos foram lavados e suspensos em 10 ml de PBS estéril para produzir uma suspensão de 1×10^7 UFC/ml. Recolheu-se o sangue completo de ratinhos Balb/c naíve com 6 semanas de idade e adicionou-se REFLUDAN™ (lepirudina, Bayer) para uma concentração final de 50 µg/ml. Retirou-se uma alíquota de 450 µl de sangue para um tubo eppendorf de 1 ml e misturou-se com 50 µl da amostra bacteriana (1×10^5 UFC/ml). As amostras foram incubadas a 37 °C com rotação lenta. Retiraram-se alíquotas de 100 µl aos 0 e aos 30 minutos, misturaram-se 1:1 com solução de saponina a 2% em PBS e incubaram-se em gelo durante 30 minutos. Prepararam-se cinco diluições em série de 1:10 e espalharam-se alíquotas de 10 µl em meio TSA agarizado, para a formação e contagem de colônias.

Para avaliar a atividade de coagulação sanguínea bacteriana, adicionaram-se 10 µl da cultura-stock bacteriana referida acima a 100 µl de sangue de ratinho anticoagulado, num tubo de ensaio de plástico estéril (BD falcon), para obter uma concentração final de 1×10^5 UFC/ml. Para a perturbação com os anticorpos, adicionaram-se à mistura 10 µl adicionais de PBS contendo 3×10^{-5} Mol de anticorpo. Para avaliar as proteínas recombinantes, adicionaram-se 10 µl da proteína em tampão PBS para uma concentração final de 50 µM. Os tubos de ensaio foram incubados à temperatura ambiente e a liquidez ou coagulação do sangue foi verificada mediante inclinação dos tubos a 45° a intervalos cronometrados.

Purificação de proteínas. Para os estudos de vacinação, a sequência codificante completa da Coa ou da vWbp madura foi clonada no vetor pET15b utilizando os iniciadores Coa_foward_XhoI, Coa_reverse_BamHI, vWbp_forward_XhoI e vWbp_reverse_BamHI (Tabela 10), para obter His₆-Coa e His₆-vWbp. A estirpe de *E. coli* BL21(DE3) contendo os vetores de expressão foi crescida a 37 °C e induzida com IPTG 1 mM após duas horas. Quatro horas após a indução, as células foram

centrifugadas a 6000 xg, suspensas em tampão de coluna 1x (Tris-HCl 0,1 M pH 7,5; NaCl 0,5 M) e lisadas numa célula de pressão French a 140000 lb/pol². Os lisados foram submetidos a ultracentrifugação a 40000 xg durante 30 minutos, e o sobrenadante foi sujeito a cromatografia em Ni-NTA e lavado com tampão de coluna contendo imidazol 25 µM, seguido de eluição com imidazol 500 µM. O eluato foi dialisado com PBS 1x. Para remover a endotoxina, adicionou-se Triton-X114 1:1000 e a solução foi arrefecida durante 5 minutos, incubada a 37 °C durante 10 minutos e centrifugada a 13000 xg. O sobrenadante foi carregado numa coluna de dessalinização HiTrap para remover qualquer vestígio de Triton-X114.

Tabela 10. Iniciadores utilizados neste estudo

Nome do iniciador	Sequência
attB1_Coa	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTgatgactaagttgaaaa aagaag (SEQ ID NO:46)
Coa1_BamHI	aaGGATCCcctccaaaatgtaattgccc (SEQ ID NO:47)
Coa2_BamHI	aaGGATCCgtttgtaactctatccaaagac (SEQ ID NO:48)
attbB2_Coa	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTgacacctattgcacgat tcg (SEQ ID NO:49)
attB1_vWF	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTcagatagcgattcagat tcag (SEQ ID NO:50)
vWF1_BamHI	aaGGATCCctgtatctctccttaattttcc (SEQ ID NO:51)
vWF2_BamHI	aaGGATCCcatggctgcaaagcaaataatg (SEQ ID NO:52)
attbB2_vWF	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTgccttggtgtaacaaat ttatg (SEQ ID NO:53)
Coa_promoter_BamHI_F	gaaGGATCCgttttattctagttaatatatagttaatg (SEQ ID NO:54)
Coa_out_PstI_R	gaaCTGCAGctgtatgtctttggatagagttac (SEQ ID NO:55)
vWbp_promoter_BamHI_F	gaaGGATCCggtggcttttttacttgattttc (SEQ ID NO:56)
vWbp_out_PstI_R	gaaCTGCAGcgacaaactcattatttgctttgc (SEQ ID NO:57)
Coa_foward_XhoI	GAACTCGAGTCTAGCTTATTTACATGG (SEQ ID NO:58)
Coa_Xho_factorXa_F	GAACTCGAGatagaaggcagaatagtaacaaaggattatagtggg (SEQ ID NO:59)
Coa_reverse_BamHI	GTAGGATCCTGGGATAGAGTTACAAAC (SEQ ID NO:60)

vWbp_forward_XhoI	GAACTCGAGgcattatgtgtatcacaaatttggg (SEQ ID NO:61)
vWbp_Xho_factorXa_F	GAACTCGAGatagaaggcagagtggtttctggggagaagaatc (SEQ ID NO:62)
vWbp_reverse_BamHI	GAACTCGAGgcagccatgcattaattatttgcc (SEQ ID NO:63)

Para os estudos enzimáticos, os ensaios ELISA e a SPR, a sequência codificante completa da Coa ou da vWbp madura foi clonada no vetor pET15b com os iniciadores Coa_Xho_factorXa_F, Coa_reverse_BamHI, vWbp_Xho_factorXa_F e vWbp_reverse_BamHI (Tabela 10), que contêm um sítio do Fator Xa precedendo a sequência Ile-Val-Thr-Lys inicial da coagulase e a sequência Val-Val-Ser-Gly inicial da vWbp. Estas proteínas foram expressas e purificadas utilizando o protocolo acima e depois foram clivadas com 10 unidades de Fator Xa/1 ml durante 1 hora a 25 °C, para remover a marca His₆ da extremidade N-terminal. As proteínas foram, em seguida, carregadas numa coluna Superdex 75 (GE Healthcare) para a purificação final. Todas as proteínas eluídas foram armazenadas em PBS 1x.

Anticorpos de coelho. A concentração de proteína foi determinada utilizando um kit de BCA (Thermo Scientific). A pureza foi verificada por análise do gel de SDS-PAGE e coloração com azul brilhante de Coomassie. Coelhos New Zealand brancos, fêmea, com 6 meses de idade (Charles River Laboratories) foram imunizados com 500 µg de proteína emulsionada em CFA (Difco) para a imunização inicial ou em IFA para as imunizações de reforço, nos dias 24 e 48. No dia 60, os coelhos foram sangrados e o soro foi recuperado para ser submetido a experiências de imunotransferência ou transferência passiva. Para a purificação dos anticorpos, a proteína His₆-Coa ou His₆-vWbp recombinante (5 mg) foi ligada covalentemente a colunas HiTrap HP ativadas com NHS (GE Healthcare). Esta matriz contendo o antigénio foi depois utilizada para a cromatografia de afinidade de 10-20 ml de soro de coelho a 4 °C. A matriz carregada foi lavada com 50 volumes de coluna de PBS, e os anticorpos foram eluídos com tampão de eluição (glicina 1 M, pH 2,5; NaCl 0,5 M) e imediatamente neutralizados com Tris-HCl 1M, pH 8,5. Os

anticorpos purificados foram dialisados durante a noite contra PBS a 4 °C.

Ressonância de plasma de superfície. A afinidade e as velocidades de associação e dissociação foram medidas num BIAcore 3000. Os tampões foram esterilizados por filtração e degaseificados. Um chip CM5 foi preparado para ligação via grupos amina por injeção de protrombina humana (500 nM, pH 4,0) (Innovative Research) e fibrinogénio humano (200 nM, pH 4,5) (Innovative Research) na presença de EDC 0,2 M e NHS 0,05 M. Para medir a interação da coagulase com a protrombina e o fibrinogénio, a Coa foi diluída em tampão HBS-P (HEPES 20 mM [pH 7,4]; NaCl 150 mM; 0,005% [vol/vol] tensoativo P20) em concentrações de 0 - 75 nM, com injeções sucessivas de coagulase durante 300 segundos, seguidas de 300 segundos para a dissociação, seguida de regeneração com NaOH (50 µl, 30 segundos). K_D e χ^2 foram determinados utilizando o software BiaEvaluation, e o melhor ajuste foi determinado com um modelo de ligação 1:1 com desvio da linha de base e R_{max} local. A interação do fator de von Willebrand com a protrombina e o fibrinogénio foi medida da mesma forma. Todas as experiências foram repetidas em triplicado. As experiências de inibição com anticorpos policlonais foram efetuadas por meio de injeções sucessivas de coagulase (25 nM) incubada com α Coa em concentrações de 0 nM - 200 nM, nas mesmas condições de injeção descritas acima. O vWF (50 nM) foi incubado de modo idêntico com α vWF em concentrações de 0 nM - 400 nM. A diferença de resposta foi medida como a alteração das unidades de resposta desde antes da injeção até ao final da injeção.

Medições da atividade de coagulase. Protrombina 1×10^{-16} M (Innovative Research) foi pré-incubada durante 20 minutos com uma quantidade equimolar de coagulase ou vWbp funcional à temperatura ambiente, seguida da adição de S-2238 (um substrato cromogénico) para uma concentração final de 1 mM, num volume total de tampão de reação de 100 µl de PBS 1x. A alteração da absorvância foi medida a 450 nm durante 10 minutos num espectrofotómetro, representada graficamente em função do tempo e ajustada a uma curva linear. O declive da curva (dA/dt) foi interpretado como sendo a velocidade da hidrólise de S-2238 e, por conseguinte, um reflexo da função enzimática (% de atividade do complexo coagulase-protrombina ou vWbp-

protrombina). O ensaio foi repetido na presença de anticorpos específicos ou cruzados num excesso de 3 M (3×10^{-16} M) e os dados foram normalizados para a % de atividade média sem inibição.

Modelo de abscesso renal e provocação letal. As culturas das estirpes de estafilococos crescidas durante a noite foram diluídas de 1:100 em meio TSB fresco e crescidas até atingirem uma DO_{600} de 0,4. Centrifugaram-se 10 ml de bactérias a 7500 xg, lavou-se e suspendeu-se em 10 ml de PBS 1x. Ratinhos BALB/c fêmeas com seis semanas de idade (Charles River) foram injetados retro-orbitalmente com 1×10^7 UFC da suspensão de estafilococos em 100 μ l de PBS. Utilizaram-se coortes de 10 ratinhos. No quinto dia após a infeção, estes ratinhos foram mortos por asfixia com CO_2 e os seus rins foram excisados. Todos os órgãos foram examinados quanto à presença de lesões à superfície e 8-10 rins direitos foram enviados para secção histopatológica e coloração com hematoxilina-eosina. Estas lâminas foram examinadas por microscopia ótica quanto à presença de abscessos internos. Para o modelo de provocação letal, todas as condições experimentais permaneceram as mesmas, com exceção da administração de 1×10^8 UFC de estafilococos e da monitorização dos ratinhos durante 10 dias após a infeção relativamente à sobrevivência.

Coloração imuno-histoquímica de secções renais. Os rins secionados foram desparafinados e reidratados através de xileno e diluições em série do EtOH para água destilada. Foram incubados em tampão de recuperação antigénica (DAKO, pH 6,0) e aquecidos num vaporizador a mais de 96 °C durante 20 minutos. Após lavagem, as lâminas foram incubadas em peróxido de hidrogénio a 3% durante 5 minutos e, em seguida, em soro normal a 10% em PBS contendo 0,025% de Tritonx-100 durante 30 minutos. Utilizou-se IgG humana a 10% como reagente de bloqueio durante uma incubação de 30 minutos (Sigma-Aldrich). O anticorpo primário foi aplicado nas lâminas para incubação durante a noite a 4 °C numa câmara de humidade. Os anticorpos primários usados foram anticorpo de rato anti-protrombina de ratinho 1:500 (Innovative Research), anticorpo de coelho anti-fibrinogénio de ratinho 1:500 (Innovative Research), anticorpo de coelho anti-estafilocagulase 1:250 ou anticorpo de coelho anti-vwbp de estafilococos. Após lavagem com TBS, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário biotinilado

(diluição 1:50 de anticorpo anti-IgG de rato biotinilado, BA-4001 de Vector Laboratories; ou diluição 1:200 de anticorpo anti-IgG de coelho biotinilado, BA-1000 de Vector) e depois com os reagentes ABC (Vector Laboratories). A ligação antigénio-anticorpo foi detetada pelo sistema de substrato cromogénico DAB. A lâmina foi imersa brevemente em hematoxilina para contracoloração e avaliada por microscopia ótica.

Imunização ativa. Ratinhos BALB/c com 3 semanas de idade foram injetados com 50 µg de proteína emulsionada em 100 µl de CFA. Utilizaram-se coortes de 15 ratinhos, reservando-se 5 ratinhos para sangramento e determinação dos títulos de anticorpos. Onze dias após a vacinação, estes ratinhos foram reforçados com 50 µg de proteína emulsionada em 100 µl de IFA. No dia 21, os ratinhos foram injetados com 1×10^7 UFC de estafilococos para o modelo de abscesso renal ou 1×10^8 UFC para a provocação letal. No momento da infeção, 5 ratinhos foram sangrados para obter os títulos de anticorpos.

Transferência passiva de anticorpos. Vinte e quatro horas antes da infeção, ratinhos BALB/c com seis semanas de idade foram injetados com anticorpos purificados contra Coa e/ou vWbp, numa dose de 5 mg/kg de peso corporal. Utilizaram-se coortes de 10 ratinhos. Estes ratinhos foram provocados por injeção retro-orbital com 1×10^7 UFC (modelo de abscesso renal) ou 1×10^8 UFC de estafilococos (bacteriemia letal).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

As seguintes referências bibliográficas fornecem pormenores exemplificativos sobre o procedimento ou de outro tipo suplementares àqueles aqui apresentados.

Patente U.S. 3,791,932
Patente U.S. 3,949,064
Patente U.S. 4,174,384
Patente U.S. 4,338,298
Patente U.S. 4,356,170
Patente U.S. 4,367,110
Patente U.S. 4,372,945
Patente U.S. 4,452,901
Patente U.S. 4,474,757
Patente U.S. 4,554,101
Patente U.S. 4,578,770
Patente U.S. 4,596,792
Patente U.S. 4,599,230
Patente U.S. 4,599,231
Patente U.S. 4,601,903
Patente U.S. 4,608,251
Patente U.S. 4,683,195
Patente U.S. 4,683,202
Patente U.S. 4,684,611
Patente U.S. 4,690,915
Patente U.S. 4,690,915
Patente U.S. 4,748,018
Patente U.S. 4,800,159
Patente U.S. 4,879,236
Patente U.S. 4,952,500
Patente U.S. 5,084,269
Patente U.S. 5,199,942
Patente U.S. 5,221,605
Patente U.S. 5,238,808
Patente U.S. 5,302,523
Patente U.S. 5,310,687
Patente U.S. 5,322,783
Patente U.S. 5,384,253
Patente U.S. 5,464,765
Patente U.S. 5,512,282
Patente U.S. 5,512,282
Patente U.S. 5,538,877
Patente U.S. 5,538,880
Patente U.S. 5,548,066

Patente U.S. 5,550,318
Patente U.S. 5,563,055
Patente U.S. 5,580,859
Patente U.S. 5,589,466
Patente U.S. 5,591,616
Patente U.S. 5,610,042
Patente U.S. 5,620,896
Patente U.S. 5,648,240
Patente U.S. 5,656,610
Patente U.S. 5,702,932
Patente U.S. 5,736,524
Patente U.S. 5,780,448
Patente U.S. 5,789,215
Patente U.S. 5,801,234
Patente U.S. 5,840,846
Patente U.S. 5,843,650
Patente U.S. 5,846,709
Patente U.S. 5,846,783
Patente U.S. 5,849,497
Patente U.S. 5,849,546
Patente U.S. 5,849,547
Patente U.S. 5,858,652
Patente U.S. 5,866,366
Patente U.S. 5,871,986
Patente U.S. 5,916,776
Patente U.S. 5,922,574
Patente U.S. 5,925,565
Patente U.S. 5,925,565
Patente U.S. 5,928,905
Patente U.S. 5,928,906
Patente U.S. 5,932,451
Patente U.S. 5,935,819
Patente U.S. 5,935,825
Patente U.S. 5,939,291
Patente U.S. 5,942,391
Patente U.S. 5,945,100
Patente U.S. 5,958,895
Patente U.S. 5,981,274
Patente U.S. 5,994,624
Patente U.S. 6,00,8341
Patente U.S. 6,288,214
Patente U.S. 6,294,177
Patente U.S. 6,651,655
Patente U.S. 6,656,462
Patente U.S. 6,733,754
Patente U.S. 6,756,361

- Patente U.S. 6,770,278
Patente U.S. 6,793,923
Patente U.S. 6,814,971
Patente U.S. 6,936,258
Pedido de Patente U.S. 2002/0169288
Pedido de Patente U.S. 2003/0153022
- Abdallah *et al.*, *Mol. Microbiol.*, 62, 667-679, 2006.
- Abdallah *et al.*, *Nat. Rev. Microbiol.*, 5, 883-891, 2007.
- Albus *et al.*, *Infect. Immun.*, 59:1008-1014, 1991.
- An, *J. Virol.*, 71(3):2292-302, 1997.
- Anavi, Sc. thesis from the department of Molecular Microbiology and Biotechnology of the Tel-Aviv University, Israel, 1998.
- Andersen *et al.*, *J. Immunol.*, 154, 3359-3372, 1995.
- Angel *et al.*, *Cell*, 49:729,1987b.
- Angel *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:2256, 1987a.
- Archer, *Clin. Infect. Dis.*, 26, 1179-1181, 1998.
- Atchison and Perry, *Cell*, 46:253, 1986.
- Atchison and Perry, *Cell*, 48:121, 1987.
- Ausubel *et al.*, *In: Current Protocols in Molecular Biology*, John, Wiley & Sons, Inc, New York, 1996.
- Baba *et al.*, *J. Bacteriol.* 190:300-310, 2007.
- Bae and Schneewind, *Plasmid*, 55:58-63, 2006.
- Bae *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101,12312-12317,2004.
- Banerji *et al.*, *Cell*, 27(2 Pt 1):299-308, 1981.
- Banerji *et al.*, *Cell*, 33(3):729-740, 1983.
- Barany and Merrifield, *In: The Peptides*, Gross and Meienhofer (Eds.), Academic Press, NY, 1-284, 1979.

- Behring EA. Über das Zustandekommen der Diphtherie - Immunität bei Thieren. Deutsche Medizinische Wochenschrift, 16:1145-8, 1890.
- Bellus, *J.Macromol.Sci.PureAppl.Chem.*, A31(1):1355-1376,1994.
- Berkhout *et al.*, *Cell*, 59:273-282, 1989.
- Birch-Hirschfeld, L. 1934. Über die Agglutination von Staphylokokken durch Bestandteile des Säugetierblutplasmas. Klinische Wochenschrift 13:331.
- Bjerketorp *et al.*, *FEMSMicrobiol. Lett.*, 234:309-314, 2004.
- Blanar *et al.*, *EMBO J.*, 8:1139, 1989.
- Bodine and Ley, *EMBO J.*, 6:2997, 1987.
- Borrebaeck, In: *Antibody Engineering--A Practical Guide*, W. H. Freeman and Co., 1992.
- Boshart *et al.*, *Cell*, 41:521, 1985.
- Bosze *et al.*, *EMBO J.*, 5(7):1615-1623, 1986.
- Boucher and Corey. *Clin. Infect. Dis.* 46:S334-S349, 2008.
- Braddock *et al.*, *Cell*, 58:269, 1989.
- Brown *et al.*, *Biochemistry*, 37:4397-4406,1998.
- Bubeck Wardenburg and Schneewind. *J.Exp.Med.*205:287-294,2008.
- Bubeck-Wardenburg *et al.*, *Infect. Immun.* 74:1040-1044, 2007.
- Bubeck-Wardenburg *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:13831-13836, 2006.
- Bulla and Siddiqui, *J. Virol.*, 62:1437, 1986.
- Burke *et al.*, *J. Inf. Dis.*, 170:1110-1119, 1994.
- Burlak *et al.*, *Cell Microbiol.*, 9:1172-1190, 2007.
- Burts and Missiakas, *Mol. Microbiol.*, 69:736-46, 2008.

- Burts *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102:1169-1174, 2005.
- Campbell and Villarreal, *Mol. Cell. Biol.*, 8:1993, 1988.
- Campere and Tilghman, *Genes and Dev.*, 3:537, 1989.
- Campo *et al.*, *Nature*, 303:77, 1983.
- Carbonelli *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 177(1):75-82, 1999.
- Cedergren *et al.*, *Protein Eng.*, 6:441-448, 1993.
- Celander and Haseltine, *J. Virology*, 61:269, 1987.
- Celander *et al.*, *J. Virology*, 62:1314, 1988.
- Cespedes *et al.*, *J. Infect. Dis.*, 191(3):444-52, 2005.
- Champion *et al.*, *Science*, 313:1632-1636, 2006.
- Chandler *et al.*, *Cell*, 33:489, 1983.
- Chandler *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(8):3596-601, 1997.
- Chang *et al.*, *Lancet.*, 362(9381):362-369, 2003.
- Chang *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:2153, 1989.
- Chatterjee *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:9114, 1989.
- Chen and Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7(8):2745-2752, 1987.
- Cheng *et al.*, *FASEB J.*, 23:1-12, 2009.
- Choi *et al.*, *Cell*, 53:519, 1988.
- Cocca, *Biotechniques*, 23(5):814-816, 1997.
- Cohen *et al.*, *J. Cell. Physiol.*, 5:75, 1987.
- Cosgrove *et al.*, *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 26:166-174, 2005.
- Costa *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:81, 1988.
- Cripe *et al.*, *EMBO J.*, 6:3745, 1987.

- Culotta and Hamer, *Mol. Cell. Biol.*, 9:1376, 1989.
- Dalbey and Wickner, *J. Biol. Chem.*, 260:15925-15931, 1985.
- Dandolo *et al.*, *J. Virology*, 47:55-64, 1983.
- De Villiers *et al.*, *Nature*, 312(5991):242-246, 1984.
- DeBord *et al.*, *Infect. Immun.*, 74:4910-4914, 2006.
- DeDent *et al.*, *EMBO J.* 27:2656-2668, 2008.
- DeDent *et al.*, *J. Bacteriol.* 189:4473-4484, 2007.
- Deisenhofer *et al.*, *Hoppe-Seyh Zeitsch. Physiol. Chem.* 359:975-985, 1978.
- Deisenhofer, *Biochemistry* 20:2361-2370, 1981.
- Deschamps *et al.*, *Science*, 230:1174-1177, 1985.
- Devereux *et al.*, *Nucl. Acid Res.*, 12:387-395, 1984.
- Diep *et al.*, *J. Infect. Dis.*, 193:1495-1503, 2006a.
- Diep *et al.*, *Lancet.*, 367:731-739, 2006b.
- Dinges *et al.*, *Clin. Microbiol. Rev.*, 13:16-34, 2000.
- Duthie and Lorenz, *J. Gen. Microbiol.*, 6:95-107, 1952.
- Edbrooke *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:1908, 1989.
- Edlund *et al.*, *Science*, 230:912-916, 1985.
- Ekstedt and Yotis, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 80:496-500, 1960.
- Emorl and Gaynes, *Clin. Microbiol. Rev.*, 6:428-442, 1993.
- EP 0786519
- EP 497524
- EP 497525

Epitope Mapping Protocols In: *Methods in Molecular Biology*,
Vol. 66, Morris (Ed.), 1996.

Fechheimer, *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 84:8463-8467,
1987.

Feng and Holland, *Nature*, 334:6178, 1988.

Field and Smith, *J. Comp. Pathol.*, 55:63, 1945.

Firak and Subramanian, *Mol. Cell. Biol.*, 6:3667, 1986.

Foecking and Hofstetter, *Gene*, 45(1):101-105, 1986.

Fortune *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 102:10676-10681,
2005.

Foster, *Nat. Rev. Microbiol.*, 3:948-958, 2005.

Fournier *et al.*, *Infect. Immun.*, 45:87-93, 1984.

Fraley *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979.

Friedrich *et al.*, *Nature*, 425:535-539, 2003.

Fujita *et al.*, *Cell*, 49:357, 1987.

Gilles *et al.*, *Cell*, 33:717, 1983.

Gloss *et al.*, *EMBO J.*, 6:3735, 1987.

Godbout *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:1169, 1988.

Gomez *et al.*, *EMBO J.* 26:701-709, 2007..

Gomez *et al.*, *J. Biol. Chem.* 281:20190-20196, 2006.

Gomez *et al.*, *Nature Med.* 10:842-8, 2004.

Goodbourn and Maniatis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:1447,
1988.

Goodbourn *et al.*, *Cell*, 45:601, 1986.

Goodyear and Silverman, *J. Exp. Med.*, 197:1125-1139, 2003.

- Goodyear and Silverman, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 101:11392-11397, 2004.
- Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985.
- Gouda *et al.*, *Biochemistry*, 31(40):9665-72, 1992.
- Gouda *et al.*, *Biochemistry*, 37:129-36, 1998.
- Graham and Van Der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973.
- Graille *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 97:5399-5404, 2000.
- Greene *et al.*, *Immunology Today*, 10:272, 1989.
- Grosschedl and Baltimore, *Cell*, 41:885, 1985.
- Guinn *et al.*, *Mol. Microbiol.*, 51:359-370, 2004.
- Guss *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 138:413-420, 1984.
- Harland and Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101(3):1094-1099, 1985.
- Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., Chapter 8, 1988.
- Hartleib *et al.*, *Blood* 96:2149-2156, 2000.
- Harvey *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:1084-1088, 1986.
- Haslinger and Karin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:8572, 1985.
- Hauber and Cullen, *J. Virology*, 62:673, 1988.
- Hen *et al.*, *Nature*, 321:249, 1986.
- Hensel *et al.*, *Lymphokine Res.*, 8:347, 1989.
- Herr and Clarke, *Cell*, 45:461, 1986.
- Hirochika *et al.*, *J. Virol.*, 61:2599, 1987.
- Hirsch *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:1959, 1990.
- Holbrook *et al.*, *Virology*, 157:211, 1987.

- Horlick and Benfield, *Mol. Cell. Biol.*, 9:2396, 1989.
- Hsu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:12420-12425, 2003.
- Huang et al., *Cell*, 27:245, 1981.
- Hug et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8:3065, 1988.
- Huston et al., *In: Methods in Enzymology*, Langone (Ed.), Academic Press, NY, 203:46-88, 1991.
- Hwang et al., *Mol. Cell. Biol.*, 10:585, 1990.
- Imagawa et al., *Cell*, 51:251, 1987.
- Imbra and Karin, *Nature*, 323:555, 1986.
- Imler et al., *Mol. Cell. Biol.*, 7:2558, 1987.
- Imperiale and Nevins, *Mol. Cell. Biol.*, 4:875, 1984.
- Innis et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 85(24):9436-9440, 1988.
- Inouye and Inouye, *Nucleic Acids Res.*, 13: 3101-3109, 1985.
- Jakobovits et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8:2555, 1988.
- Jameel and Siddiqui, *Mol. Cell. Biol.*, 6:710, 1986.
- Jansson et al., *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 20:69-78 1998.
- Jaynes et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8:62, 1988.
- Jensen, *Acta Path. Microbiol. Scandin.* 44:421-428, 1958.
- Johnson et al., *Methods in Enzymol.*, 203:88-99, 1991.
- Johnson et al., *Mol. Cell. Biol.*, 9:3393, 1989.
- Jones, *Carb. Research*, 340:1097-1106, 2005.
- Jonsson et al., *Oral Dis.*, 8(3):130-140, 2002.
- Joyce et al., *Carbohydrate Research* 338:903-922 (2003
- Kadesch and Berg, *Mol. Cell. Biol.*, 6:2593, 1986.

- Kaeppler et al., *Plant Cell Rep.*, 8:415-418, 1990.
- Kaneda et al., *Science*, 243:375-378, 1989.
- Karin et al., *Mol. Cell. Biol.*, 7:606, 1987.
- Katinka et al., *Cell*, 20:393, 1980.
- Kato et al., *J Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991.
- Kawamoto et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8:267, 1988.
- Kennedy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:1327-1332, 2008.
- Kiledjian et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8:145, 1988.
- Kinoshita, M., N. Kobayashi, S. Nagashima, M. Ishino, S. Otokozawa, K. Mise, A. Sumi, H. Tsutsumi, N. Uehara, N. Watanabe, and M. Endo. 2008. Diversity of staphylocoagulase and identification of novel variants of staphylocoagulase gene in *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Immunol.* 52:334-348.
- Klamut et al., *Mol. Cell. Biol.*, 10:193, 1990.
- Klevens et al., *Clin. Infect. Dis.*, 2008; 47:927-30, 2008.
- Klevens et al., *JAMA*, 298:1763-1771, 2007.
- Koch et al., *Mol. Cell. Biol.*, 9:303, 1989.
- Kohler and Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975)
- Kriegler and Botchan, In: *Eukaryotic Viral Vectors*, Gluzman (Ed.), Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1982.
- Kriegler and Botchan, *Mol. Cell. Biol.*, 3:325, 1983.
- Kriegler et al., *Cell*, 38:483, 1984a.
- Kriegler et al., *Cell*, 53:45, 1988.
- Kriegler et al., In: *Cancer Cells 2/Oncogenes and Viral Genes*, Van de Woude et al. eds, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, 1984b.

- Kroh *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106:7786-7791, 2009.
Kuhl *et al.*, *Cell*, 50:1057, 1987.
- Kuklin *et al.*, *Infect. Immun.*, 74:2215-23, 2006.
- Kunz *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 17:1121, 1989.
- Kuroda *et al.*, *Lancet.*, 357:1225-1240, 2001.
- Kyte and Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157(1):105-132, 1982.
- Lagergard *et al.*, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 11:341-5, 1992.
- Lam *et al.*, *J. Bacteriol.*, 86:87-91, 1963.
- Larsen *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. USA.*, 83:8283, 1986, 1963.
- Laspia *et al.*, *Cell*, 59:283, 1989.
- Latimer *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:760, 1990.
- Lee *et al.*, *Nature*, 294:228, 1981.
- Lee *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 12:4191-206, 1984.
- Lee, *Trends Microbiol.* 4(4):162-166, 1996.
- Levenson *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 9(8):1233-1236, 1998.
- Levinson *et al.*, *Nature*, 295:79, 1982.
- Lin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:850, 1990.
- Lowy, *New Engl. J. Med.*, 339:520-532, 1998.
- Luria *et al.*, *EMBO J.*, 6:3307, 1987.
- Lusky and Botchan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:3609, 1986.
- Lusky *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 3:1108, 1983.
- Macejak and Sarnow, *Nature*, 353:90-94, 1991.
- MacGurn *et al.*, *Mol. Microbiol.*, 57:1653-1663, 2005.

- Maira-Litran *et al.*, *Infect. Immun.*, 70:4433-4440, 2002.
- Maira-Litran *et al.*, *Vaccine*, 22:872-879, 2004.
- Majors and Varmus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:5866, 1983.
- Markwardt, *Untersuchungen über Hirudin. Naturwissenschaften*, 41:537-538, 1955.
- Mazmanian *et al.*, *Mol. Microbiol.* 40, 1049-1057, 2001.
- Mazmanian *et al.*, *Mol. Microbiol.*, 40(5):1049-1057, 2001.
- Mazmanian *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:5510-5515, 2000.
- Mazmanian *et al.*, *Science*, 285(5428):760-3, 1999.
- McLaughlin *et al.*, *PLoS Pathog.*, 3:e105, 2007.
- McNeall *et al.*, *Gene*, 76:81, 1989.
- Mernaugh *et al.*, *In: Molecular Methods in Plant Pathology*, Singh *et al.* (Eds.), CRC Press Inc., Boca Raton, FL, 359-365, 1995.
- Merrifield, *Science*, 232(4748):34-1-347, 1986.
- Miksicek *et al.*, *Cell*, 46:203, 1986.
- Mordacq and Linzer, *Genes and Dev.*, 3:760, 1989.
- Moreau *et al.*, *Carbohydrate Res.*, 201:285-297, 1990.
- Moreau *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 9:6047, 1981.
- Moreillon *et al.*, *Infect. Immun.*, 63:4738-4743, 1995.
- Moreillon *et al.*, *Infect. Immun.*, 63:4738-4743, 1995.
- Mosmann and Coffman, *Ann. Rev. Immunol.*, 7:145-173, 1989.
- Muesing *et al.*, *Cell*, 48:691, 1987.
- Musher *et al.*, *Medicine (Baltimore)*, 73:186-208, 1994.

Navarre and Schneewind, *J. Biol. Chem.*, 274:15847-15856, 1999.

Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443, 1970.

Ng et al., *Nuc. Acids Res.*, 17:601, 1989.

Nicolau and Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.

Nicolau et al., *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987.

Novick, *Mol. Microbiol.*, 48:1429-1449, 2003.

O'Brien et al., *Mol. Microbiol.* 44:1033-1044, 2002.

O'Seaghdha et al., *FEBS J.* 273:4831-4841, 2006.

Omirulleh et al., *Plant Mol. Biol.*, 21(3):415-28, 1993.

Ondek et al., *EMBO J.*, 6:1017, 1987.

Ornitz et al., *Mol. Cell. Biol.*, 7:3466, 1987.

Pallen, *Trends Microbiol.*, 10:209-212, 2002.

Palmiter et al., *Nature*, 300:611, 1982.

Palmqvist et al., *Microbes. Infect.*, 7:1501-11, 2005.

Panizzi et al., *J. Biol. Chem.*, 281:1179-1187, 2006.

Pedido GB 2 202 328

Pedido PCT PCT/US89/01025

Pedido PCT WO 00/02523

Pedido PCT WO 00/12132

Pedido PCT WO 00/12689

Pedido PCT WO 00/15238

Pedido PCT WO 01/34809

Pedido PCT WO 01/60852

Pedido PCT WO 01/98499

Pedido PCT WO 02/059148

Pedido PCT WO 02/094868

Pedido PCT WO 03/53462

Pedido PCT WO 04/43407

Pedido PCT WO 06/032472

Pedido PCT WO 06/032475

Pedido PCT WO 06/032500

Pedido PCT WO 07/113222

Pedido PCT WO 07/113223

Pedido PCT WO 94/09699

Pedido PCT WO 95/06128

Pedido PCT WO 95/08348

Pedido PCT WO 98/57994

Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:2444, 1988.

Pech *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:396, 1989.

Pelletier and Sonenberg, *Nature*, 334(6180):320-325, 1988.

Perez-Stable and Constantini, *Mol. Cell. Biol.*, 10:1116, 1990.

Phonimdaeng *et al.*, *Mol. Microbiol.*, 4:393-404, 1990.

Picard and Schaffner, *Nature*, 307:83, 1984.

Pinkert *et al.*, *Genes and Dev.*, 1:268, 1987.

Ponta *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:1020, 1985.

Porton *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:1076, 1990.

- Potrykus *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 199(2):169-177, 1985.
- Pugsley, *Microbiol. Rev.*, 57:50-108, 1993.
- Pym *et al.*, *Mol. Microbiol.*, 46:709-717, 2002.
- Pym *et al.*, *Nat. Med.*, 9:533-539, 2003.
- Queen and Baltimore, *Cell*, 35:741, 1983.
- Quinn *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:4713, 1989.
- Redondo *et al.*, *Science*, 247:1225, 1990.
- Reisman and Rotter, *Mol. Cell. Biol.*, 9:3571, 1989.
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1289-1329, 1990.
- Resendez Jr. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:4579, 1988.
- Ripe *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:2224, 1989.
- Rippe, *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.
- Rittling *et al.*, *Nuc. Acids Res.*, 17:1619, 1989.
- Roben *et al.*, *J. Immunol.* 154:6437-6445, 1995.
- Rosen *et al.*, *Cell*, 41:813, 1988.
- Sakai *et al.*, *Genes and Dev.*, 2:1144, 1988.
- Salid-Salim *et al.*, *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 24:451-455, 2003.
- Sambrook *et al.*, *In: Molecular cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001.
- Schaffner *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 201:81, 1988.
- Schneewind *et al.*, *Cell* 70:267-281, 1992.
- Schneewind *et al.*, *EMBO*, 12:4803-4811, 1993.
- Schneewind *et al.*, *Science*, 268:103-6, 1995.

- Searle *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 5:1480, 1985.
- Sharp and Marciniak, *Cell*, 59:229, 1989.
- Shaul and Ben-Levy, *EMBO J.*, 6:1913, 1987.
- Shaw *et al.*, *Microbiology*, 150:217-228, 2004.
- Sheagren, *N. Engl. J. Med.* 310:1368-1373, 1984.
- Sherman *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:50, 1989.
- Shopsin *et al.*, *J. Clin. Microbiol.*, 37:3556-63, 1999.
- Sibbald *et al.*, *Microbiol. Mol Biol. Rev.*, 70:755-788, 2006.
- Silverman and Goodyear. *Nat. Rev. Immunol.*, 6:465-75, 2006.
- Sjodahl, *Eur. J. Biochem.* 73:343-351, 1977.
- Sjoquist *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 30:190-194, 1972.
- Sleigh and Lockett, *J. EMBO*, 4:3831, 1985.
- Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2:482, 1981.
- Smith *et al.*, *Brit. J. Exp. Pathol.*, 28:57, 1947.
- Sorensen *et al.*, *Infect. Immun.*, 63:1710-1717, 1995.
- Spalholz *et al.*, *Cell*, 42:183, 1985.
- Spandau and Lee, *J. Virology*, 62:427, 1988.
- Spandidos and Wilkie, *EMBO J.*, 2:1193, 1983.
- Stanley *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:13001-13006, 2003.
- Stephens and Hentschel, *Biochem. J.*, 248:1, 1987.
- Stewart and Young, In: *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2d. ed., Pierce Chemical Co., 1984.

- Stranger-Jones *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 103:16942-16947, 2006.
- Stuart *et al.*, *Nature*, 317:828; 1985.
- Studier *et al.*, *Methods Enzymol.* 185:60-89 1990.
- Sullivan and Peterlin, *Mol. Cell. Biol.*, 7:3315, 1987.
- Swartzendruber and Lehman, *J. Cell. Physiology*, 85:179, 1975.
- Takebe *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:466, 1988.
- Tam *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 105:6442, 1983.
- Tavernier *et al.*, *Nature*, 301:634, 1983.
- Taylor and Kingston, *Mol. Cell. Biol.*, 10:165, 1990a.
- Taylor and Kingston, *Mol. Cell. Biol.*, 10:176, 1990b.
- Taylor *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264:15160, 1989.
- Thiesen *et al.*, *J. Virology*, 62:614, 1988.
- Thomson *et al.*, *J. Immunol.*, 157(2):822-826, 1996.
- Tigges *et al.*, *J. Immunol.*, 156(10):3901-3910, 1996.
- Tigges *et al.*, *J. Immunol.*, 156(10):3901-3910, 1996.
- Ton-That *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96(22):12424-9, 1999.
- Treisman, *Cell*, 42:889, 1985.
- Tronche *et al.*, *Mol. Biol. Med.*, 7:173, 1990.
- Trudel and Constantini, *Genes and Dev.*, 6:954, 1987.
- Tyndell *et al.*, *Nuc. Acids. Res.*, 9:6231, 1981.
- Uhlen *et al.*, *J. Biol. Chem.* 259:1695-1702 and 13628 (Corr.) 1984.
- van den Ent and Lowe, *FEBS Lett.*, 579:3837-3841, 2005.

- van Wely *et al.*, *FEMS Microbiol. Rev.*, 25:437-454, 2001.
- Vannice and Levinson, *J. Virology*, 62:1305, 1988.
- Vasseur *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 77:1068, 1980.
- Vaughan, *et al.*, *Nat. Biotech.* 16; 535-539, 1998.
- Wang and Calame, *Cell*, 47:241, 1986.
- Weber *et al.*, *Cell*, 36:983, 1984.
- Weinberger *et al.* *Mol. Cell. Biol.*, 8:988, 1984.
- Weiss *et al.*, *J. Antimicrob. Chemother.*, 53(3):480-6, 2004.
- Winoto and Baltimore, *Cell*, 59:649, 1989.
- Wong *et al.*, *Gene*, 10:87-94, 1980.
- Xu *et al.*, *J. Infect. Dis.*, 189:2323-2333, 2004.
- Xu *et al.*, *Mol. Microbiol.*, 66(3):787-800, 2007.
- Yutzey *et al.* *Mol. Cell. Biol.*, 9:1397, 1989.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> SCHNEEWIND, OLAF
 CHENG, ALICE G.
 MISSIAKAS, DOMINIQUE M.
 KIM, HWAN

<120> COMPOSIÇÕES E MÉTODOS RELACIONAOS COM VARIANTES DA
 PROTEÍNA A (Spa)

<130> ARCD:482WO

<140> DESCONHECIDO
 <141> 2010-04-05

<150> 61/237,956
 <151> 2009-12-18

<160> 63

<170> PatentIn versão 3.5

<210> 1
 <211> 150
 <212> ADN
 <213> Staphylococcus sp.

<400> 1
ttcaacaag atcaacaag cgccttctat gaaatcttga acatgcctaa cttaaacgaa 60
gogcaacgta acggcttcat tcaaagtctt aaagacgacc caagccaaag cactaatggt 120
ttaggtgaag ctaaaaaatt aaacgaatct 150

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

<400> 2

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

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

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

Lys Lys Leu Asn Glu Ser
 50

<210> 3

<211> 51

<212> PRT

<213> Staphylococcus sp.

<400> 3

Gln His Asp Glu Ala Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Gln Val Leu Asn Met

1 5 10 15

Pro Asn Leu Asn Ala Asp Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys
 20 25 30

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

Asn Asp Ser
 50

<210> 4

<211> 52

<212> PRT

<213> Staphylococcus sp.

<400> 4

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

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

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

Leu Asn Glu Ser
 50

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

<400> 5

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

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

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

Leu Asn Asp Ala
50

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

<400> 6

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

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

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

Leu Asn Asp Ala
50

<210> 7
 <211> 52
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus sp.

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(8)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido existente naturalmente

<220>

<221> misc_feature

<222> (34)..(35)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido existente naturalmente

<400> 7

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

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

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

Leu Asn Glu Ser
50

<210> 8

<211> 52

<212> PRT

<213> Staphylococcus sp.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(8)

<223> onde X é qualquer aminoácido diferente de Q

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(35)

<223> onde Y é qualquer aminoácido diferente D

<400> 8

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

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

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

Leu Asn Glu Ser
50

<210> 9

<211> 450

<212> PRT

<213> Staphylococcus sp.

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser
 115 120 125

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

Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn Asn Phe Asn Lys
 145 150 155 160

Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn
 165 170 175

Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser
 180 185 190

Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ser Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln
 195 200 205

Ala Pro Lys Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe
 210 215 220

Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly
 225 230 235 240

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

Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Glu Glu Asp
 260 265 270

Asn Lys Lys Pro Gly Lys Glu Asp Gly Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp
 275 280 285

Gly Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp Asn Lys Lys Pro Gly Lys Glu Asp
 290 295 300

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

Gly Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp Asn Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp
 325 330 335

Gly Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp Gly Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp
 340 345 350

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

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

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

Lys Lys Gln Pro Ala Asn His Ala Asp Ala Asn Lys Ala Gln Ala Leu

Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser
 180 185 190

Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ser Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln
 195 200 205

Ala Pro Lys Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe
 210 215 220

Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly
 225 230 235 240

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

Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Glu Glu Asp
 260 265 270

Asn Lys Lys Pro Gly Lys Glu Asp Gly Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp
 275 280 285

Gly Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp Asn Lys Lys Pro Gly Lys Glu Asp
 290 295 300

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

Gly Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp Asn Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp
 325 330 335

Gly Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp Gly Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp
 340 345 350

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

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

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

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

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

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

Glu Leu
 450

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

<400> 11

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

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

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

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

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

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

Gln

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

<400> 12

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Leu Asp Arg Val
100

<210> 13

<211> 1385

<212> PRT

<213> Staphylococcus sp.

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Lys Val Asp Ala Lys Thr Glu Ser Thr Thr Leu Asn Val Lys Ser

Pro Lys Tyr Pro Thr Asn Ile Gly Gln Ile Asn Gln Asn Val Thr Asn
 450 455 460

Ile Lys Ile Tyr Arg Val Pro Glu Gly Tyr Thr Leu Asn Lys Gly Tyr
 465 470 475 480

Asp Val Asn Thr Asn Asp Leu Val Asp Val Thr Asp Glu Phe Lys Asn
 485 490 495

Lys Met Thr Tyr Gly Ser Asn Gln Ser Val Asn Leu Asp Phe Gly Asp
 500 505 510

Ile Thr Ser Ala Tyr Val Val Met Val Asn Thr Lys Phe Gln Tyr Thr
 515 520 525

Asn Ser Glu Ser Pro Thr Leu Val Gln Met Ala Thr Leu Ser Ser Thr
 530 535 540

Gly Asn Lys Ser Val Ser Thr Gly Asn Ala Leu Gly Phe Thr Asn Asn
 545 550 555 560

Gln Ser Gly Gly Ala Gly Gln Glu Val Tyr Lys Ile Gly Asn Tyr Val
 565 570 575

Trp Glu Asp Thr Asn Lys Asn Gly Val Gln Glu Leu Gly Glu Lys Gly
 580 585 590

Val Gly Asn Val Thr Val Thr Val Phe Asp Asn Asn Thr Asn Thr Lys
 595 600 605

Val Gly Glu Ala Val Thr Lys Glu Asp Gly Ser Tyr Leu Ile Pro Asn
 610 615 620

Leu Pro Asn Gly Asp Tyr Arg Val Glu Phe Ser Asn Leu Pro Lys Gly
 625 630 635 640

Tyr Glu Val Thr Pro Ser Lys Gln Gly Asn Asn Glu Glu Leu Asp Ser
 645 650 655

Asn Gly Leu Ser Ser Val Ile Thr Val Asn Gly Lys Asp Asn Leu Ser
 660 665 670

Ala Asp Leu Gly Ile Tyr Lys Pro Lys Tyr Asn Leu Gly Asp Tyr Val
 675 680 685

Trp Glu Asp Thr Asn Lys Asn Gly Ile Gln Asp Gln Asp Glu Lys Gly
 690 695 700

Ile Ser Gly Val Thr Val Thr Leu Lys Asp Glu Asn Gly Asn Val Leu
 705 710 715 720

Lys Thr Val Thr Thr Asp Ala Asp Gly Lys Tyr Lys Phe Thr Asp Leu
 725 730 735

Asp Asn Gly Asn Tyr Lys Val Glu Phe Thr Thr Pro Glu Gly Tyr Thr
 740 745 750

Pro Thr Thr Val Thr Ser Gly Ser Asp Ile Glu Lys Asp Ser Asn Gly
 755 760 765

Leu Thr Thr Thr Gly Val Ile Asn Gly Ala Asp Asn Met Thr Leu Asp
 770 775 780

Ser Gly Phe Tyr Lys Thr Pro Lys Tyr Asn Leu Gly Asn Tyr Val Trp
 785 790 795 800

Glu Asp Thr Asn Lys Asp Gly Lys Gln Asp Ser Thr Glu Lys Gly Ile
 805 810 815

Ser Gly Val Thr Val Thr Leu Lys Asn Glu Asn Gly Glu Val Leu Gln
 820 825 830

Thr Thr Lys Thr Asp Lys Asp Gly Lys Tyr Gln Phe Thr Gly Leu Glu
 835 840 845

Asn Gly Thr Tyr Lys Val Glu Phe Glu Thr Pro Ser Gly Tyr Thr Pro
 850 855 860

Thr Gln Val Gly Ser Gly Thr Asp Glu Gly Ile Asp Ser Asn Gly Thr
 865 870 875 880

Ser Thr Thr Gly Val Ile Lys Asp Lys Asp Asn Asp Thr Ile Asp Ser
 885 890 895

Gly Phe Tyr Lys Pro Thr Tyr Asn Leu Gly Asp Tyr Val Trp Glu Asp
 900 905 910

Thr Asn Lys Asn Gly Val Gln Asp Lys Asp Glu Lys Gly Ile Ser Gly
 915 920 925

Val Thr Val Thr Leu Lys Asp Glu Asn Asp Lys Val Leu Lys Thr Val
 930 935 940

Thr Thr Asp Glu Asn Gly Lys Tyr Gln Phe Thr Asp Leu Asn Asn Gly
 945 950 955 960

Thr Tyr Lys Val Glu Phe Glu Thr Pro Ser Gly Tyr Thr Pro Thr Ser
 965 970 975

Val Thr Ser Gly Asn Asp Thr Glu Lys Asp Ser Asn Gly Leu Thr Thr
 980 985 990

Thr Gly Val Ile Lys Asp Ala Asp Asn Met Thr Leu Asp Ser Gly Phe
 995 1000 1005

Tyr Lys Thr Pro Lys Tyr Ser Leu Gly Asp Tyr Val Trp Tyr Asp
 1010 1015 1020

Ser Asn Lys Asp Gly Lys Gln Asp Ser Thr Glu Lys Gly Ile Lys
 1025 1030 1035

Asp Val Lys Val Ile Leu Leu Asn Glu Lys Gly Glu Val Ile Gly
 1040 1045 1050

Thr Thr Lys Thr Asp Glu Asn Gly Lys Tyr Arg Phe Asp Asn Leu
 1055 1060 1065

Asp Ser Gly Lys Tyr Lys Val Ile Phe Glu Lys Pro Thr Gly Leu
 1070 1075 1080

Thr Gln Thr Gly Thr Asn Thr Thr Glu Asp Asp Lys Asp Ala Asp
 1085 1090 1095

Gly Gly Glu Val Asp Val Thr Ile Thr Asp His Asp Asp Phe Thr
 1100 1105 1110

Leu Asp Asn Gly Tyr Tyr Glu Glu Glu Thr Ser Asp Ser Asp Ser
 1115 1120 1125

Asp Ser Asp
 1130 1135 1140

Ser Asp Ser
 1145 1150 1155

Asp Ser Asp
 1160 1165 1170

Ser Asp Ser
 1175 1180 1185

Asp Ser Asp
 1190 1195 1200

Ser Asp Ser

1205	1210	1215
Asp Ser 1220	Asp Ser Asp Ser Asp 1225	Ser Asp Ser Asp Ser 1230
Ser Asp 1235	Ser Asp Ser Asp Ser 1240	Ser Asp Ser Asp Ser 1245
Asp Ser 1250	Asp Ser Asp Ser Asp 1255	Ser Asp Ser Asp Ser 1260
Ser Asp 1265	Ser Asp Ser Asp Ser 1270	Ser Asp Ser Asp Ser 1275
Asp Ser 1280	Asp Ser Asp Ser Asp 1285	Ser Asp Ser Asp Ser 1290
Ser Asp 1295	Ser Asp Ser Asp Ser 1300	Ser Asp Ser Asp Ser 1305
Asp Ser 1310	Asp Ser Asp Ser Asp 1315	Ser Asp Ser Asp Ser 1320
Ser Asp 1325	Ala Gly Lys His Thr 1330	Pro Val Lys Pro Met 1335
Lys Asp 1340	His His Asn Lys Ala 1345	Lys Ala Leu Pro Glu 1350
Glu Asn 1355	Ser Gly Ser Asn Asn 1360	Ala Thr Leu Phe Gly 1365
Ala Ala 1370	Leu Gly Ser Leu Leu 1375	Leu Phe Gly Arg Arg 1380
Asn Lys 1385		

<210> 14

<211> 1141

<212> PRT

<213> Staphylococcus sp.

<400> 14

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Asn Asn Asp Val Thr Thr Lys Pro Ser Thr Ser Glu Ile Gln Thr
 165 170 175

Lys Pro Thr Thr Pro Gln Glu Ser Thr Asn Ile Glu Asn Ser Gln Pro
 180 185 190

Gln Pro Thr Pro Ser Lys Val Asp Asn Gln Val Thr Asp Ala Thr Asn
 195 200 205

Pro Lys Glu Pro Val Asn Val Ser Lys Glu Glu Leu Lys Asn Asn Pro
 210 215 220

Glu Lys Leu Lys Glu Leu Val Arg Asn Asp Asn Asn Thr Asp Arg Ser
 225 230 235 240

Thr Lys Pro Val Ala Thr Ala Pro Thr Ser Val Ala Pro Lys Arg Leu
 245 250 255

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

Asn Asn Val Asn Asp Leu Ile Thr Val Thr Lys Gln Thr Ile Lys Val
 275 280 285

Gly Asp Gly Lys Asp Asn Val Ala Ala Ala His Asp Gly Lys Asp Ile
 290 295 300

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

Thr Met Thr Ile Asn Tyr Asp Lys Asn Val Ile Pro Ser Asp Leu Thr
 325 330 335

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

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

Thr Asp Tyr Val Asp Lys Tyr Glu Asp Ile Lys Ala Arg Leu Thr Leu
 370 375 380

Tyr Ser Tyr Ile Asp Lys Gln Ala Val Pro Asn Glu Thr Ser Leu Asn
 385 390 395 400

Leu Thr Phe Ala Thr Ala Gly Lys Glu Thr Ser Gln Asn Val Ser Val
 405 410 415

Asp Tyr Gln Asp Pro Met Val His Gly Asp Ser Asn Ile Gln Ser Ile
 420 425 430

Phe Thr Lys Leu Asp Glu Asn Lys Gln Thr Ile Glu Gln Gln Ile Tyr
 435 440 445

Val Asn Pro Leu Lys Lys Thr Ala Thr Asn Thr Lys Val Asp Ile Ala
 450 455 460

Gly Ser Gln Val Asp Asp Tyr Gly Asn Ile Lys Leu Gly Asn Gly Ser
 465 470 475 480

Thr Ile Ile Asp Gln Asn Thr Glu Ile Lys Val Tyr Lys Val Asn Pro
 485 490 495

Asn Gln Gln Leu Pro Gln Ser Asn Arg Ile Tyr Asp Phe Ser Gln Tyr
 500 505 510

Glu Asp Val Thr Ser Gln Phe Asp Asn Lys Lys Ser Phe Ser Asn Asn
 515 520 525

Val Ala Thr Leu Asp Phe Gly Asp Ile Asn Ser Ala Tyr Ile Ile Lys
 530 535 540

Val Val Ser Lys Tyr Thr Pro Thr Ser Asp Gly Glu Leu Asp Ile Ala

Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ala Gly
 1070 1075 1080

Lys His Thr Pro Val Lys Pro Met Ser Thr Thr Lys Asp His His
 1085 1090 1095

Asn Lys Ala Lys Ala Leu Pro Glu Thr Gly Ser Glu Asn Asn Gly
 1100 1105 1110

Ser Asn Asn Ala Thr Leu Phe Gly Gly Leu Phe Ala Ala Leu Gly
 1115 1120 1125

Ser Leu Leu Leu Phe Gly Arg Arg Lys Lys Gln Asn Lys
 1130 1135 1140

<210> 15

<211> 350

<212> PRT

<213> Staphylococcus sp.

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Val Glu Pro Gly Tyr Lys Ser Leu Thr Thr Lys Val His Ile Val

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

Glu Arg Gln Val Tyr Glu Leu Asn Lys Ile Gln Asp Lys Leu Pro Glu
 290 295 300

Lys Leu Lys Ala Glu Tyr Lys Lys Lys Leu Glu Asp Thr Lys Lys Ala
 305 310 315 320

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

Pro Thr Asn Glu Lys Met Thr Asp Leu Gln Asp Thr Lys Tyr Val Val
 340 345 350

Tyr Glu Ser Val Glu Asn Asn Glu Ser Met Met Asp Thr Phe Val Lys
 355 360 365

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Thr Thr Gln Asn Val Ala Lys Pro Thr Thr Ala Ser Ser Lys

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

Asp Pro Thr Pro Gly Pro Pro Val Asp Pro Glu Pro Ser Pro Asp Pro
545 550 555 560

Glu Pro Glu Pro Thr Pro Asp Pro Glu Pro Ser Pro Asp Pro Glu Pro
565 570 575

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

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

Asp Ser Glu Ser
610 615 620

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

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

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

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

Asp Ser
690 695 700

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

Asp Ser
725 730 735

Asp Ser
740 745 750

Asp Ser
755 760 765

Asp Ser
770 775 780

Asp Ser
785 790 795 800

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

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

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

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

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

<210> 19

<211> 227

<212> PRT

<213> Staphylococcus sp.

<400> 19

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Thr Asp Val Ala Gly Ala Asn Ala Pro Gly Lys Asp Asp Lys Asn

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

Ala Thr Thr Lys Tyr Gly Glu Lys Asp Asp Lys Asn Asp Glu Ala Met
 165 170 175

Val Asn Lys Ala Leu Glu Asp Leu Asp His Leu Asn Gln Gln Ile His
 180 185 190

Lys Ser Lys Asp Ala Leu Lys Asp Ala Ser Lys Asp Pro Ala Val Ser
 195 200 205

Thr Thr Asp Ser Asn His Glu Val Ala Lys Thr Pro Asn Asn Asp Gly
 210 215 220

Ser Gly His Val Val Leu Asn Lys Phe Leu Ser Asn Glu Glu Asn Gln
 225 230 235 240

Ser His Ser Asn Gln Leu Thr Asp Lys Leu Gln Gly Ser Asp Lys Ile
 245 250 255

Asn His Ala Met Ile Glu Lys Leu Ala Lys Ser Asn Ala Ser Thr Gln
 260 265 270

His Tyr Thr Tyr His Lys Leu Asn Thr Leu Gln Ser Leu Asp Gln Arg
 275 280 285

Ile Ala Asn Thr Gln Leu Pro Lys Asn Gln Lys Ser Asp Leu Met Ser
 290 295 300

Glu Val Asn Lys Thr Lys Glu Arg Ile Lys Ser Gln Arg Asn Ile Ile
 305 310 315 320

Leu Glu Glu Leu Ala Arg Thr Asp Asp Lys Lys Tyr Ala Thr Gln Ser
 325 330 335

Ile Leu Glu Ser Ile Phe Asn Lys Asp Glu Ala Asp Lys Ile Leu Lys
 340 345 350

Asp Ile Arg Val Asp Gly Lys Thr Asp Gln Gln Ile Ala Asp Gln Ile
 355 360 365

Thr Arg His Ile Asp Gln Leu Ser Leu Thr Thr Ser Asp Asp Leu Leu
 370 375 380

Thr Ser Leu Ile Asp Gln Ser Gln Asp Lys Ser Leu Leu Ile Ser Gln
 385 390 395 400

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

Asp Trp Thr Asn Lys Gly Leu Ser Asn Arg Gln Ile Val Asp Gln Leu
 420 425 430

Lys Lys His Phe Ala Ser Thr Gly Asp Thr Ser Ser Asp Asp Ile Leu
 435 440 445

Lys Ala Ile Leu Asn Asn Ala Lys Asp Lys Lys Gln Ala Ile Glu Thr
 450 455 460

Ile Leu Ala Thr Arg Ile Glu Arg Gln Lys Ala Lys Leu Leu Ala Asp
 465 470 475 480

Leu Ile Thr Lys Ile Glu Thr Asp Gln Asn Lys Ile Phe Asn Leu Val
 485 490 495

Lys Ser Ala Leu Asn Gly Lys Ala Asp Asp Leu Leu Asn Leu Gln Lys
 500 505 510

Arg Leu Asn Gln Thr Lys Lys Asp Ile Asp Tyr Ile Leu Ser Pro Ile
 515 520 525

Val Asn Arg Pro Ser Leu Leu Asp Arg Leu Asn Lys Asn Gly Lys Thr
 530 535 540

Thr Asp Leu Asn Lys Leu Ala Asn Leu Met Asn Gln Gly Ser Asn Leu
 545 550 555 560

Leu Asp Ser Ile Pro Asp Ile Pro Thr Pro Lys Pro Glu Lys Thr Leu
 565 570 575

Thr Leu Gly Lys Gly Asn Gly Leu Leu Ser Gly Leu Leu Asn Ala Asp
 580 585 590

Gly Asn Val Ser Leu Pro Lys Ala Gly Glu Thr Ile Lys Glu His Trp
 595 600 605

Leu Pro Ile Ser Val Ile Val Gly Ala Met Gly Val Leu Met Ile Trp
 610 615 620

Leu Ser Arg Arg Asn Lys Leu Lys Asn Lys Ala
 625 630 635

<210> 21

<211> 953

<212> PRT

<213> Staphylococcus sp.

<400> 21

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

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

Ile Leu Val Gly Thr Thr Leu Ile Phe Gly Leu Ser Gly His Glu Ala
 35 40 45

Lys Ala Ala Glu His Thr Asn Gly Glu Leu Asn Gln Ser Lys Asn Glu
 50 55 60

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

Gln Leu Lys Asp Asn Thr Gln Thr Ala Thr Ala Asp Gln Pro Lys Val
 85 90 95

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

Ser Pro Gln Asn Ala Thr Ala Ser Gln Ser Thr Thr Gln Thr Ser Asn
 115 120 125

Val Thr Thr Asn Asp Lys Ser Ser Thr Thr Tyr Ser Asn Glu Thr Asp
 130 135 140

Lys Ser Asn Leu Thr Gln Ala Lys Asn Val Ser Thr Thr Pro Lys Thr
 145 150 155 160

Thr Thr Ile Lys Gln Arg Ala Leu Asn Arg Met Ala Val Asn Thr Val
 165 170 175

Ala Ala Pro Gln Gln Gly Thr Asn Val Asn Asp Lys Val His Phe Thr
 180 185 190

Asn Ile Asp Ile Ala Ile Asp Lys Gly His Val Asn Lys Thr Thr Gly
 195 200 205

Asn Thr Glu Phe Trp Ala Thr Ser Ser Asp Val Leu Lys Leu Lys Ala
 210 215 220

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

Lys Tyr Gly Gln Tyr Phe Arg Pro Gly Ser Val Arg Leu Pro Ser Gln
 245 250 255

Thr Gln Asn Leu Tyr Asn Ala Gln Gly Asn Ile Ile Ala Lys Gly Ile
 260 265 270

Tyr Asp Ser Lys Thr Asn Thr Thr Thr Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Val
 275 280 285

Asp Gln Tyr Thr Asn Val Ser Gly Ser Phe Glu Gln Val Ala Phe Ala
 290 295 300

Lys Arg Glu Asn Ala Thr Thr Asp Lys Thr Ala Tyr Lys Met Glu Val
 305 310 315 320

Thr Leu Gly Asn Asp Thr Tyr Ser Lys Asp Val Ile Val Asp Tyr Gly
 325 330 335

Asn Gln Lys Gly Gln Gln Leu Ile Ser Ser Thr Asn Tyr Ile Asn Asn
 340 345 350

Glu Asp Leu Ser Arg Asn Met Thr Val Tyr Val Asn Gln Pro Lys Lys
 355 360 365

Thr Tyr Thr Lys Glu Thr Phe Val Thr Asn Leu Thr Gly Tyr Lys Phe
 370 375 380

Asn Pro Asp Ala Lys Asn Phe Lys Ile Tyr Glu Val Thr Asp Gln Asn
 385 390 395 400

Gln Phe Val Asp Ser Phe Thr Pro Asp Thr Ser Lys Leu Lys Asp Val
 405 410 415

Thr Gly Gln Phe Asp Val Ile Tyr Ser Asn Asp Asn Lys Thr Ala Thr
 420 425 430

Val Asp Leu Leu Asn Gly Gln Ser Ser Ser Asp Lys Gln Tyr Ile Ile
 435 440 445

Gln Gln Val Ala Tyr Pro Asp Asn Ser Ser Thr Asp Asn Gly Lys Ile
 450 455 460

Asp Tyr Thr Leu Glu Thr Gln Asn Gly Lys Ser Ser Trp Ser Asn Ser
 465 470 475 480

Tyr Ser Asn Val Asn Gly Ser Ser Thr Ala Asn Gly Asp Gln Lys Lys
 485 490 495

Tyr Asn Leu Gly Asp Tyr Val Trp Glu Asp Thr Asn Lys Asp Gly Lys
 500 505 510

Gln Asp Ala Asn Glu Lys Gly Ile Lys Gly Val Tyr Val Ile Leu Lys
 515 520 525

Asp Ser Asn Gly Lys Glu Leu Asp Arg Thr Thr Thr Asp Glu Asn Gly
 530 535 540

Lys Tyr Gln Phe Thr Gly Leu Ser Asn Gly Thr Tyr Ser Val Glu Phe
 545 550 555 560

Ser Thr Pro Ala Gly Tyr Thr Pro Thr Thr Ala Asn Ala Gly Thr Asp
 565 570 575

Asp Ala Val Asp Ser Asp Gly Leu Thr Thr Thr Gly Val Ile Lys Asp
 580 585 590

Ala Asp Asn Met Thr Leu Asp Ser Gly Phe Tyr Lys Thr Pro Lys Tyr
 595 600 605

Ser Leu Gly Asp Tyr Val Trp Tyr Asp Ser Asn Lys Asp Gly Lys Gln
 610 615 620

Asp Ser Thr Glu Lys Gly Ile Lys Gly Val Lys Val Thr Leu Gln Asn
 625 630 635 640

Glu Lys Gly Glu Val Ile Gly Thr Thr Glu Thr Asp Glu Asn Gly Lys
 645 650 655

Tyr Arg Phe Asp Asn Leu Asp Ser Gly Lys Tyr Lys Val Ile Phe Glu
 660 665 670

Lys Pro Ala Gly Leu Thr Gln Thr Gly Thr Asn Thr Thr Glu Asp Asp
 675 680 685

Lys Asp Ala Asp Gly Gly Glu Val Asp Val Thr Ile Thr Asp His Asp
 690 695 700

Asp Phe Thr Leu Asp Asn Gly Tyr Tyr Glu Glu Glu Thr Ser Asp Ser
 705 710 715 720

Asp Ser
 725 730 735

Asp Ser
 740 745 750

Asp Ser
 755 760 765

Asp Ser Asp Ser Glu Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser

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 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	Ser Gly	Ser Asp	Ser Asp		
	580			585		590						
Ser Ala	Ser Asp	Ser Asp	Ser Ala	Ser Asp	Ser Asp	Ser Ala	Ser Asp	Ser Ala	Ser Asp	Ser Asp		
	595		600			605						
Ser Asp	Ser Ala	Ser Asp	Ser Asp	Ser Ala	Ser Asp	Ser Asp	Ser Ala	Ser Asp	Ser Ala	Ser Ala		
	610			615		620						
Ser Asp	Ser Asp	Ser Ala	Ser Asp	Ser Asp	Ser Ala	Ser Asp	Ser Ala	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp		
	625		630			635				640		
Ser Ala	Ser Asp	Ser Asp	Ser Ala	Ser Asp	Ser Asp	Ser Ala	Ser Asp	Ser Ala	Ser Asp	Ser Asp		
			645			650				655		
Ser Asp	Ser Ala	Ser Asp	Ser Asp	Ser Ala	Ser Asp							
	660				665					670		
Ser Asp												
	675				680					685		
Ser Asp												
	690				695					700		
Ser Asp												
	705		710			715				720		
Ser Asp												
			725			730				735		
Ser Asp												
			740			745				750		
Ser Asp												
	755				760					765		
Ser Asp												
	770				775					780		
Ser Asp												
	785		790			795				800		
Ser Asp												
			805			810				815		
Ser Asp	Ser Asp	Ser Ala	Ser Asp	Ser Glu								
	820				825					830		

Ser Asp
835 840 845

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

Ser Asp Ser Glu Ser Asp
865 870 875 880

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

Ser Asp Ser Asp Ser Thr Ser Asp Thr Gly Ser Asp Asn Asp Ser Asp
900 905 910

Ser Asp Ser Asn Ser Asp Ser Glu Ser Gly Ser Asn Asn Asn Val Val
915 920 925

Pro Pro Asn Ser Pro Lys Asn Gly Thr Asn Ala Ser Asn Lys Asn Glu
930 935 940

Ala Lys Asp Ser Lys Glu Pro Leu Pro Asp Thr Gly Ser Glu Asp Glu
945 950 955 960

Ala Asn Thr Ser Leu Ile Trp Gly Leu Leu Ala Ser Leu Gly Ser Leu
965 970 975

Leu Leu Phe Arg Arg Lys Lys Glu Asn Lys Asp Lys Lys
980 985

<210> 23

<211> 584

<212> PRT

<213> Staphylococcus sp.

<400> 23

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

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

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

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

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

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

Asp Ile Asp Leu Arg Leu Ser Lys Gln Ala Lys Tyr Thr Val Tyr Phe
 100 105 110

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

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

Asp Thr Lys Lys Gln Val Glu Asp Lys Lys Lys Asp Lys Ala Asn Tyr
 145 150 155 160

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

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

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

Val Asp Leu Arg Leu Ser Lys Gln Ala Lys Tyr Thr Val Asn Phe Lys
 210 215 220

Asn Gly Thr Lys Lys Val Ile Asp Leu Lys Ser Gly Ile Tyr Thr Ala
 225 230 235 240

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

Thr Lys Lys His Ile Glu Asn Lys Ala Lys Arg Asn Tyr Gln Val Pro
 260 265 270

Tyr Ser Ile Asn Leu Asn Gly Thr Ser Thr Asn Ile Leu Ser Asn Leu
 275 280 285

Ser Phe Ser Asn Lys Pro Trp Thr Asn Tyr Lys Asn Leu Thr Ser Gln
 290 295 300

Ile Lys Ser Val Leu Lys His Asp Arg Gly Ile Ser Glu Gln Asp Leu
 305 310 315 320

Lys Tyr Ala Lys Lys Ala Tyr Tyr Thr Val Tyr Phe Lys Asn Gly Gly

<400> 24

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

Asp Pro Ile Asn Asn Lys Asp Leu Gln Leu Ala Tyr Lys Glu Leu Glu
 225 230 235 240
 Gln Ala Val Ala Leu Ile Arg Thr Met Pro Gln Arg Gln Gln Thr Ser
 245 250 255
 Arg Arg Ser Asn Arg Ile Gln Thr Arg Ser Val Glu Ser Arg Ala Ala
 260 265 270
 Glu Pro Arg Ser Val Ser Asp Tyr Gln Asn Ala Asn Ser Ser Tyr Tyr
 275 280 285
 Val Glu Asn Ala Asn Asp Gly Ser Gly Tyr Pro Val Gly Thr Tyr Ile
 290 295 300
 Asn Ala Ser Ser Lys Gly Ala Pro Tyr Asn Leu Pro Thr Thr Pro Trp
 305 310 315 320
 Asn Thr Leu Lys Ala Ser Asp Ser Lys Glu Ile Ala Leu Met Thr Ala
 325 330 335
 Lys Gln Thr Gly Asp Gly Tyr Gln Trp Val Ile Lys Phe Asn Lys Gly
 340 345 350
 His Ala Pro His Gln Asn Met Ile Phe Trp Phe Ala Leu Pro Ala Asp
 355 360 365
 Gln Val Pro Val Gly Arg Thr Asp Phe Val Thr Val Asn Ser Asp Gly
 370 375 380
 Thr Asn Val Gln Trp Ser His Gly Ala Gly Ala Gly Ala Asn Lys Pro
 385 390 395 400
 Leu Gln Gln Met Trp Glu Tyr Gly Val Asn Asp Pro His Arg Ser His
 405 410 415
 Asp Phe Lys Ile Arg Asn Arg Ser Gly Gln Val Ile Tyr Asp Trp Pro
 420 425 430
 Thr Val His Ile Tyr Ser Leu Glu Asp Leu Ser Arg Ala Ser Asp Tyr
 435 440 445
 Phe Ser Glu Ala Gly Ala Thr Pro Ala Thr Lys Ala Phe Gly Arg Gln
 450 455 460
 Asn Phe Glu Tyr Ile Asn Gly Gln Lys Pro Ala Glu Ser Pro Gly Val
 465 470 475 480
 Pro Lys Val Tyr Thr Phe Ile Gly Gln Gly Asp Ala Ser Tyr Thr Ile

				485						490										495
Ser	Phe	Lys	Thr	Gln	Gly	Pro	Thr	Val	Asn	Lys	Leu	Tyr	Tyr	Ala	Ala					
				500						505				510						
Gly	Gly	Arg	Ala	Leu	Glu	Tyr	Asn	Gln	Leu	Phe	Met	Tyr	Ser	Gln	Leu					
		515					520					525								
Tyr	Val	Glu	Ser	Thr	Gln	Asp	His	Gln	Gln	Arg	Leu	Asn	Gly	Leu	Arg					
	530					535					540									
Gln	Val	Val	Asn	Arg	Thr	Tyr	Arg	Ile	Gly	Thr	Thr	Lys	Arg	Val	Glu					
545					550					555					560					
Val	Ser	Gln	Gly	Asn	Val	Gln	Thr	Lys	Lys	Val	Leu	Glu	Ser	Thr	Asn					
				565					570						575					
Leu	Asn	Ile	Asp	Asp	Phe	Val	Asp	Asp	Pro	Leu	Ser	Tyr	Val	Lys	Thr					
			580					585					590							
Pro	Ser	Asn	Lys	Val	Leu	Gly	Phe	Tyr	Ser	Asn	Asn	Ala	Asn	Thr	Asn					
		595					600					605								
Ala	Phe	Arg	Pro	Gly	Gly	Ala	Gln	Gln	Leu	Asn	Glu	Tyr	Gln	Leu	Ser					
	610					615					620									
Gln	Leu	Phe	Thr	Asp	Gln	Lys	Leu	Gln	Glu	Ala	Ala	Arg	Thr	Arg	Asn					
625					630					635					640					
Pro	Ile	Arg	Leu	Met	Ile	Gly	Phe	Asp	Tyr	Pro	Asp	Ala	Tyr	Gly	Asn					
				645					650					655						
Ser	Glu	Thr	Leu	Val	Pro	Val	Asn	Leu	Thr	Val	Leu	Pro	Glu	Ile	Gln					
			660					665					670							
His	Asn	Ile	Lys	Phe	Phe	Lys	Asn	Asp	Asp	Thr	Gln	Asn	Ile	Ala	Glu					
		675					680					685								
Lys	Pro	Phe	Ser	Lys	Gln	Ala	Gly	His	Pro	Val	Phe	Tyr	Val	Tyr	Ala					
	690					695					700									
Gly	Asn	Gln	Gly	Asn	Ala	Ser	Val	Asn	Leu	Gly	Gly	Ser	Val	Thr	Ser					
705					710					715					720					
Ile	Gln	Pro	Leu	Arg	Ile	Asn	Leu	Thr	Ser	Asn	Glu	Asn	Phe	Thr	Asp					
			725						730					735						
Lys	Asp	Trp	Gln	Ile	Thr	Gly	Ile	Pro	Arg	Thr	Leu	His	Ile	Glu	Asn					
			740					745					750							

Ser Thr Asn Arg Pro Asn Asn Ala Arg Glu Arg Asn Ile Glu Leu Val
 755 760 765
 Gly Asn Leu Leu Pro Gly Asp Tyr Phe Gly Thr Ile Arg Phe Gly Arg
 770 775 780
 Lys Glu Gln Leu Phe Glu Ile Arg Val Lys Pro His Thr Pro Thr Ile
 785 790 795 800
 Thr Thr Thr Ala Glu Gln Leu Arg Gly Thr Ala Leu Gln Lys Val Pro
 805 810 815
 Val Asn Ile Ser Gly Ile Pro Leu Asp Pro Ser Ala Leu Val Tyr Leu
 820 825 830
 Val Ala Pro Thr Asn Gln Thr Thr Asn Gly Gly Ser Glu Ala Asp Gln
 835 840 845
 Ile Pro Ser Gly Tyr Thr Ile Leu Ala Thr Gly Thr Pro Asp Gly Val
 850 855 860
 His Asn Thr Ile Thr Ile Arg Pro Gln Asp Tyr Val Val Phe Ile Pro
 865 870 875 880
 Pro Val Gly Lys Gln Ile Arg Ala Val Val Tyr Tyr Asn Lys Val Val
 885 890 895
 Ala Ser Asn Met Ser Asn Ala Val Thr Ile Leu Pro Asp Asp Ile Pro
 900 905 910
 Pro Thr Ile Asn Asn Pro Val Gly Ile Asn Ala Lys Tyr Tyr Arg Gly
 915 920 925
 Asp Glu Val Asn Phe Thr Met Gly Val Ser Asp Arg His Ser Gly Ile
 930 935 940
 Lys Asn Thr Thr Ile Thr Thr Leu Pro Asn Gly Trp Thr Ser Asn Leu
 945 950 955 960
 Thr Lys Ala Asp Lys Asn Asn Gly Ser Leu Ser Ile Thr Gly Arg Val
 965 970 975
 Ser Met Asn Gln Ala Phe Asn Ser Asp Ile Thr Phe Lys Val Ser Ala
 980 985 990
 Thr Asp Asn Val Asn Asn Thr Thr Asn Asp Ser Gln Ser Lys His Val
 995 1000 1005

Ser Ile His Val Gly Lys Ile Ser Glu Asp Ala His Pro Ile Val
 1010 1015 1020
 Leu Gly Asn Thr Glu Lys Val Val Val Val Asn Pro Thr Ala Val
 1025 1030 1035
 Ser Asn Asp Glu Lys Gln Ser Ile Ile Thr Ala Phe Met Asn Lys
 1040 1045 1050
 Asn Gln Asn Ile Arg Gly Tyr Leu Ala Ser Thr Asp Pro Val Thr
 1055 1060 1065
 Val Asp Asn Asn Gly Asn Val Thr Leu His Tyr Arg Asp Gly Ser
 1070 1075 1080
 Ser Thr Thr Leu Asp Ala Thr Asn Val Met Thr Tyr Glu Pro Val
 1085 1090 1095
 Val Lys Pro Glu Tyr Gln Thr Val Asn Ala Ala Lys Thr Ala Thr
 1100 1105 1110
 Val Thr Ile Ala Lys Gly Gln Ser Phe Ser Ile Gly Asp Ile Lys
 1115 1120 1125
 Gln Tyr Phe Thr Leu Ser Asn Gly Gln Pro Ile Pro Ser Gly Thr
 1130 1135 1140
 Phe Thr Asn Ile Thr Ser Asp Arg Thr Ile Pro Thr Ala Gln Glu
 1145 1150 1155
 Val Ser Gln Met Asn Ala Gly Thr Gln Leu Tyr His Ile Thr Ala
 1160 1165 1170
 Thr Asn Ala Tyr His Lys Asp Ser Glu Asp Phe Tyr Ile Ser Leu
 1175 1180 1185
 Lys Ile Ile Asp Val Lys Gln Pro Glu Gly Asp Gln Arg Val Tyr
 1190 1195 1200
 Arg Thr Ser Thr Tyr Asp Leu Thr Thr Asp Glu Ile Ser Lys Val
 1205 1210 1215
 Lys Gln Ala Phe Ile Asn Ala Asn Arg Asp Val Ile Thr Leu Ala
 1220 1225 1230
 Glu Gly Asp Ile Ser Val Thr Asn Thr Pro Asn Gly Ala Asn Val
 1235 1240 1245

Ser Thr Ile Thr Val Asn Ile Asn Lys Gly Arg Leu Thr Lys Ser
 1250 1255 1260
 Phe Ala Ser Asn Leu Ala Asn Met Asn Phe Leu Arg Trp Val Asn
 1265 1270 1275
 Phe Pro Gln Asp Tyr Thr Val Thr Trp Thr Asn Ala Lys Ile Ala
 1280 1285 1290
 Asn Arg Pro Thr Asp Gly Gly Leu Ser Trp Ser Asp Asp His Lys
 1295 1300 1305
 Ser Leu Ile Tyr Arg Tyr Asp Ala Thr Leu Gly Thr Gln Ile Thr
 1310 1315 1320
 Thr Asn Asp Ile Leu Thr Met Leu Lys Ala Thr Thr Thr Val Pro
 1325 1330 1335
 Gly Leu Arg Asn Asn Ile Thr Gly Asn Glu Lys Ser Gln Ala Glu
 1340 1345 1350
 Ala Gly Gly Arg Pro Asn Phe Arg Thr Thr Gly Tyr Ser Gln Ser
 1355 1360 1365
 Asn Ala Thr Thr Asp Gly Gln Arg Gln Phe Thr Leu Asn Gly Gln
 1370 1375 1380
 Val Ile Gln Val Leu Asp Ile Ile Asn Pro Ser Asn Gly Tyr Gly
 1385 1390 1395
 Gly Gln Pro Val Thr Asn Ser Asn Thr Arg Ala Asn His Ser Asn
 1400 1405 1410
 Ser Thr Val Val Asn Val Asn Glu Pro Ala Ala Asn Gly Ala Gly
 1415 1420 1425
 Ala Phe Thr Ile Asp His Val Val Lys Ser Asn Ser Thr His Asn
 1430 1435 1440
 Ala Ser Asp Ala Val Tyr Lys Ala Gln Leu Tyr Leu Thr Pro Tyr
 1445 1450 1455
 Gly Pro Lys Gln Tyr Val Glu His Leu Asn Gln Asn Thr Gly Asn
 1460 1465 1470
 Thr Thr Asp Ala Ile Asn Ile Tyr Phe Val Pro Ser Asp Leu Val
 1475 1480 1485
 Asn Pro Thr Ile Ser Val Gly Asn Tyr Thr Asn His Gln Val Phe

Leu Ile Asp Gly Glu Thr Thr Pro Ile Thr Lys Thr Ala Thr Tyr
 1745 1750 1755
 Lys Val Val Arg Thr Val Pro Lys His Val Phe Glu Thr Ala Arg
 1760 1765 1770
 Gly Val Leu Tyr Pro Gly Val Ser Asp Met Tyr Asp Ala Lys Gln
 1775 1780 1785
 Tyr Val Lys Pro Val Asn Asn Ser Trp Ser Thr Asn Ala Gln His
 1790 1795 1800
 Met Asn Phe Gln Phe Val Gly Thr Tyr Gly Pro Asn Lys Asp Val
 1805 1810 1815
 Val Gly Ile Ser Thr Arg Leu Ile Arg Val Thr Tyr Asp Asn Arg
 1820 1825 1830
 Gln Thr Glu Asp Leu Thr Ile Leu Ser Lys Val Lys Pro Asp Pro
 1835 1840 1845
 Pro Arg Ile Asp Ala Asn Ser Val Thr Tyr Lys Ala Gly Leu Thr
 1850 1855 1860
 Asn Gln Glu Ile Lys Val Asn Asn Val Leu Asn Asn Ser Ser Val
 1865 1870 1875
 Lys Leu Phe Lys Ala Asp Asn Thr Pro Leu Asn Val Thr Asn Ile
 1880 1885 1890
 Thr His Gly Ser Gly Phe Ser Ser Val Val Thr Val Ser Asp Ala
 1895 1900 1905
 Leu Pro Asn Gly Gly Ile Lys Ala Lys Ser Ser Ile Ser Met Asn
 1910 1915 1920
 Asn Val Thr Tyr Thr Thr Gln Asp Glu His Gly Gln Val Val Thr
 1925 1930 1935
 Val Thr Arg Asn Glu Ser Val Asp Ser Asn Asp Ser Ala Thr Val
 1940 1945 1950
 Thr Val Thr Pro Gln Leu Gln Ala Thr Thr Glu Gly Ala Val Phe
 1955 1960 1965
 Ile Lys Gly Gly Asp Gly Phe Asp Phe Gly His Val Glu Arg Phe
 1970 1975 1980

Ile Gln Asn Pro Pro His Gly Ala Thr Val Ala Trp His Asp Ser
 1985 1990 1995

Pro Asp Thr Trp Lys Asn Thr Val Gly Asn Thr His Lys Thr Ala
 2000 2005 2010

Val Val Thr Leu Pro Asn Gly Gln Gly Thr Arg Asn Val Glu Val
 2015 2020 2025

Pro Val Lys Val Tyr Pro Val Ala Asn Ala Lys Ala Pro Ser Arg
 2030 2035 2040

Asp Val Lys Gly Gln Asn Leu Thr Asn Gly Thr Asp Ala Met Asn
 2045 2050 2055

Tyr Ile Thr Phe Asp Pro Asn Thr Asn Thr Asn Gly Ile Thr Ala
 2060 2065 2070

Ala Trp Ala Asn Arg Gln Gln Pro Asn Asn Gln Gln Ala Gly Val
 2075 2080 2085

Gln His Leu Asn Val Asp Val Thr Tyr Pro Gly Ile Ser Ala Ala
 2090 2095 2100

Lys Arg Val Pro Val Thr Val Asn Val Tyr Gln Phe Glu Phe Pro
 2105 2110 2115

Gln Thr Thr Tyr Thr Thr Thr Val Gly Gly Thr Leu Ala Ser Gly
 2120 2125 2130

Thr Gln Ala Ser Gly Tyr Ala His Met Gln Asn Ala Thr Gly Leu
 2135 2140 2145

Pro Thr Asp Gly Phe Thr Tyr Lys Trp Asn Arg Asp Thr Thr Gly
 2150 2155 2160

Thr Asn Asp Ala Asn Trp Ser Ala Met Asn Lys Pro Asn Val Ala
 2165 2170 2175

Lys Val Val Asn Ala Lys Tyr Asp Val Ile Tyr Asn Gly His Thr
 2180 2185 2190

Phe Ala Thr Ser Leu Pro Ala Lys Phe Val Val Lys Asp Val Gln
 2195 2200 2205

Pro Ala Lys Pro Thr Val Thr Glu Thr Ala Ala Gly Ala Ile Thr
 2210 2215 2220

Ile Ala Pro Gly Ala Asn Gln Thr Val Asn Thr His Ala Gly Asn
 2225 2230 2235
 Val Thr Thr Tyr Ala Asp Lys Leu Val Ile Lys Arg Asn Gly Asn
 2240 2245 2250
 Val Val Thr Thr Phe Thr Arg Arg Asn Asn Thr Ser Pro Trp Val
 2255 2260 2265
 Lys Glu Ala Ser Ala Ala Thr Val Ala Gly Ile Ala Gly Thr Asn
 2270 2275 2280
 Asn Gly Ile Thr Val Ala Ala Gly Thr Phe Asn Pro Ala Asp Thr
 2285 2290 2295
 Ile Gln Val Val Ala Thr Gln Gly Ser Gly Glu Thr Val Ser Asp
 2300 2305 2310
 Glu Gln Arg Ser Asp Asp Phe Thr Val Val Ala Pro Gln Pro Asn
 2315 2320 2325
 Gln Ala Thr Thr Lys Ile Trp Gln Asn Gly His Ile Asp Ile Thr
 2330 2335 2340
 Pro Asn Asn Pro Ser Gly His Leu Ile Asn Pro Thr Gln Ala Met
 2345 2350 2355
 Asp Ile Ala Tyr Thr Glu Lys Val Gly Asn Gly Ala Glu His Ser
 2360 2365 2370
 Lys Thr Ile Asn Val Val Arg Gly Gln Asn Asn Gln Trp Thr Ile
 2375 2380 2385
 Ala Asn Lys Pro Asp Tyr Val Thr Leu Asp Ala Gln Thr Gly Lys
 2390 2395 2400
 Val Thr Phe Asn Ala Asn Thr Ile Lys Pro Asn Ser Ser Ile Thr
 2405 2410 2415
 Ile Thr Pro Lys Ala Gly Thr Gly His Ser Val Ser Ser Asn Pro
 2420 2425 2430
 Ser Thr Leu Thr Ala Pro Ala Ala His Thr Val Asn Thr Thr Glu
 2435 2440 2445
 Ile Val Lys Asp Tyr Gly Ser Asn Val Thr Ala Ala Glu Ile Asn
 2450 2455 2460
 Asn Ala Val Gln Val Ala Asn Lys Arg Thr Ala Thr Ile Lys Asn

Ile Arg Ala Leu Gln Ser Asp Leu Thr Ser Ala Lys Asn Ser Ala
 2720 2725 2730
 Asn Ala Ile Ile Gln Lys Pro Ile Arg Thr Val Gln Glu Val Gln
 2735 2740 2745
 Ser Ala Leu Thr Asn Val Asn Arg Val Asn Glu Arg Leu Thr Gln
 2750 2755 2760
 Ala Ile Asn Gln Leu Val Pro Leu Ala Asp Asn Ser Ala Leu Lys
 2765 2770 2775
 Thr Ala Lys Thr Lys Leu Asp Glu Glu Ile Asn Lys Ser Val Thr
 2780 2785 2790
 Thr Asp Gly Met Thr Gln Ser Ser Ile Gln Ala Tyr Glu Asn Ala
 2795 2800 2805
 Lys Arg Ala Gly Gln Thr Glu Ser Thr Asn Ala Gln Asn Val Ile
 2810 2815 2820
 Asn Asn Gly Asp Ala Thr Asp Gln Gln Ile Ala Ala Glu Lys Thr
 2825 2830 2835
 Lys Val Glu Glu Lys Tyr Asn Ser Leu Lys Gln Ala Ile Ala Gly
 2840 2845 2850
 Leu Thr Pro Asp Leu Ala Pro Leu Gln Thr Ala Lys Thr Gln Leu
 2855 2860 2865
 Gln Asn Asp Ile Asp Gln Pro Thr Ser Thr Thr Gly Met Thr Ser
 2870 2875 2880
 Ala Ser Ile Ala Ala Phe Asn Glu Lys Leu Ser Ala Ala Arg Thr
 2885 2890 2895
 Lys Ile Gln Glu Ile Asp Arg Val Leu Ala Ser His Pro Asp Val
 2900 2905 2910
 Ala Thr Ile Arg Gln Asn Val Thr Ala Ala Asn Ala Ala Lys Ser
 2915 2920 2925
 Ala Leu Asp Gln Ala Arg Asn Gly Leu Thr Val Asp Lys Ala Pro
 2930 2935 2940
 Leu Glu Asn Ala Lys Asn Gln Leu Gln His Ser Ile Asp Thr Gln
 2945 2950 2955

Thr Ser Thr Thr Gly Met Thr Gln Asp Ser Ile Asn Ala Tyr Asn
 2960 2965 2970
 Ala Lys Leu Thr Ala Ala Arg Asn Lys Ile Gln Gln Ile Asn Gln
 2975 2980 2985
 Val Leu Ala Gly Ser Pro Thr Val Glu Gln Ile Asn Thr Asn Thr
 2990 2995 3000
 Ser Thr Ala Asn Gln Ala Lys Ser Asp Leu Asp His Ala Arg Gln
 3005 3010 3015
 Ala Leu Thr Pro Asp Lys Ala Pro Leu Gln Thr Ala Lys Thr Gln
 3020 3025 3030
 Leu Glu Gln Ser Ile Asn Gln Pro Thr Asp Thr Thr Gly Met Thr
 3035 3040 3045
 Thr Ala Ser Leu Asn Ala Tyr Asn Gln Lys Leu Gln Ala Ala Arg
 3050 3055 3060
 Gln Lys Leu Thr Glu Ile Asn Gln Val Leu Asn Gly Asn Pro Thr
 3065 3070 3075
 Val Gln Asn Ile Asn Asp Lys Val Thr Glu Ala Asn Gln Ala Lys
 3080 3085 3090
 Asp Gln Leu Asn Thr Ala Arg Gln Gly Leu Thr Leu Asp Arg Gln
 3095 3100 3105
 Pro Ala Leu Thr Thr Leu His Gly Ala Ser Asn Leu Asn Gln Ala
 3110 3115 3120
 Gln Gln Asn Asn Phe Thr Gln Gln Ile Asn Ala Ala Gln Asn His
 3125 3130 3135
 Ala Ala Leu Glu Thr Ile Lys Ser Asn Ile Thr Ala Leu Asn Thr
 3140 3145 3150
 Ala Met Thr Lys Leu Lys Asp Ser Val Ala Asp Asn Asn Thr Ile
 3155 3160 3165
 Lys Ser Asp Gln Asn Tyr Thr Asp Ala Thr Pro Ala Asn Lys Gln
 3170 3175 3180
 Ala Tyr Asp Asn Ala Val Asn Ala Ala Lys Gly Val Ile Gly Glu
 3185 3190 3195

Thr Thr Asn Pro Thr Met Asp Val Asn Thr Val Asn Gln Lys Ala
 3200 3205 3210
 Ala Ser Val Lys Ser Thr Lys Asp Ala Leu Asp Gly Gln Gln Asn
 3215 3220 3225
 Leu Gln Arg Ala Lys Thr Glu Ala Thr Asn Ala Ile Thr His Ala
 3230 3235 3240
 Ser Asp Leu Asn Gln Ala Gln Lys Asn Ala Leu Thr Gln Gln Val
 3245 3250 3255
 Asn Ser Ala Gln Asn Val Gln Ala Val Asn Asp Ile Lys Gln Thr
 3260 3265 3270
 Thr Gln Ser Leu Asn Thr Ala Met Thr Gly Leu Lys Arg Gly Val
 3275 3280 3285
 Ala Asn His Asn Gln Val Val Gln Ser Asp Asn Tyr Val Asn Ala
 3290 3295 3300
 Asp Thr Asn Lys Lys Asn Asp Tyr Asn Asn Ala Tyr Asn His Ala
 3305 3310 3315
 Asn Asp Ile Ile Asn Gly Asn Ala Gln His Pro Val Ile Thr Pro
 3320 3325 3330
 Ser Asp Val Asn Asn Ala Leu Ser Asn Val Thr Ser Lys Glu His
 3335 3340 3345
 Ala Leu Asn Gly Glu Ala Lys Leu Asn Ala Ala Lys Gln Glu Ala
 3350 3355 3360
 Asn Thr Ala Leu Gly His Leu Asn Asn Leu Asn Asn Ala Gln Arg
 3365 3370 3375
 Gln Asn Leu Gln Ser Gln Ile Asn Gly Ala His Gln Ile Asp Ala
 3380 3385 3390
 Val Asn Thr Ile Lys Gln Asn Ala Thr Asn Leu Asn Ser Ala Met
 3395 3400 3405
 Gly Asn Leu Arg Gln Ala Val Ala Asp Lys Asp Gln Val Lys Arg
 3410 3415 3420
 Thr Glu Asp Tyr Ala Asp Ala Asp Thr Ala Lys Gln Asn Ala Tyr
 3425 3430 3435
 Asn Ser Ala Val Ser Ser Ala Glu Thr Ile Ile Asn Gln Thr Thr

3440		3445		3450
Asn Pro Thr Met Ser Val Asp Asp Val Asn Arg Ala Thr Ser Ala 3455		3460		3465
Val Thr Ser Asn Lys Asn Ala Leu Asn Gly Tyr Glu Lys Leu Ala 3470		3475		3480
Gln Ser Lys Thr Asp Ala Ala Arg Ala Ile Asp Ala Leu Pro His 3485		3490		3495
Leu Asn Asn Ala Gln Lys Ala Asp Val Lys Ser Lys Ile Asn Ala 3500		3505		3510
Ala Ser Asn Ile Ala Gly Val Asn Thr Val Lys Gln Gln Gly Thr 3515		3520		3525
Asp Leu Asn Thr Ala Met Gly Asn Leu Gln Gly Ala Ile Asn Asp 3530		3535		3540
Glu Gln Thr Thr Leu Asn Ser Gln Asn Tyr Gln Asp Ala Thr Pro 3545		3550		3555
Ser Lys Lys Thr Ala Tyr Thr Asn Ala Val Gln Ala Ala Lys Asp 3560		3565		3570
Ile Leu Asn Lys Ser Asn Gly Gln Asn Lys Thr Lys Asp Gln Val 3575		3580		3585
Thr Glu Ala Met Asn Gln Val Asn Ser Ala Lys Asn Asn Leu Asp 3590		3595		3600
Gly Thr Arg Leu Leu Asp Gln Ala Lys Gln Thr Ala Lys Gln Gln 3605		3610		3615
Leu Asn Asn Met Thr His Leu Thr Thr Ala Gln Lys Thr Asn Leu 3620		3625		3630
Thr Asn Gln Ile Asn Ser Gly Thr Thr Val Ala Gly Val Gln Thr 3635		3640		3645
Val Gln Ser Asn Ala Asn Thr Leu Asp Gln Ala Met Asn Thr Leu 3650		3655		3660
Arg Gln Ser Ile Ala Asn Lys Asp Ala Thr Lys Ala Ser Glu Asp 3665		3670		3675
Tyr Val Asp Ala Asn Asn Asp Lys Gln Thr Ala Tyr Asn Asn Ala 3680		3685		3690

Val Ala Ala Ala Glu Thr Ile Ile Asn Ala Asn Ser Asn Pro Glu
 3695 3700 3705
 Met Asn Pro Ser Thr Ile Thr Gln Lys Ala Glu Gln Val Asn Ser
 3710 3715 3720
 Ser Lys Thr Ala Leu Asn Gly Asp Glu Asn Leu Ala Ala Ala Lys
 3725 3730 3735
 Gln Asn Ala Lys Thr Tyr Leu Asn Thr Leu Thr Ser Ile Thr Asp
 3740 3745 3750
 Ala Gln Lys Asn Asn Leu Ile Ser Gln Ile Thr Ser Ala Thr Arg
 3755 3760 3765
 Val Ser Gly Val Asp Thr Val Lys Gln Asn Ala Gln His Leu Asp
 3770 3775 3780
 Gln Ala Met Ala Ser Leu Gln Asn Gly Ile Asn Asn Glu Ser Gln
 3785 3790 3795
 Val Lys Ser Ser Glu Lys Tyr Arg Asp Ala Asp Thr Asn Lys Gln
 3800 3805 3810
 Gln Glu Tyr Asp Asn Ala Ile Thr Ala Ala Lys Ala Ile Leu Asn
 3815 3820 3825
 Lys Ser Thr Gly Pro Asn Thr Ala Gln Asn Ala Val Glu Ala Ala
 3830 3835 3840
 Leu Gln Arg Val Asn Asn Ala Lys Asp Ala Leu Asn Gly Asp Ala
 3845 3850 3855
 Lys Leu Ile Ala Ala Gln Asn Ala Ala Lys Gln His Leu Gly Thr
 3860 3865 3870
 Leu Thr His Ile Thr Thr Ala Gln Arg Asn Asp Leu Thr Asn Gln
 3875 3880 3885
 Ile Ser Gln Ala Thr Asn Leu Ala Gly Val Glu Ser Val Lys Gln
 3890 3895 3900
 Asn Ala Asn Ser Leu Asp Gly Ala Met Gly Asn Leu Gln Thr Ala
 3905 3910 3915
 Ile Asn Asp Lys Ser Gly Thr Leu Ala Ser Gln Asn Phe Leu Asp
 3920 3925 3930

Ala Asp Glu Gln Lys Arg Asn Ala Tyr Asn Gln Ala Val Ser Ala
3935 3940 3945

Ala Glu Thr Ile Leu Asn Lys Gln Thr Gly Pro Asn Thr Ala Lys
3950 3955 3960

Thr Ala Val Glu Gln Ala Leu Asn Asn Val Asn Asn Ala Lys His
3965 3970 3975

Ala Leu Asn Gly Thr Gln Asn Leu Asn Asn Ala Lys Gln Ala Ala
3980 3985 3990

Ile Thr Ala Ile Asn Gly Ala Ser Asp Leu Asn Gln Lys Gln Lys
3995 4000 4005

Asp Ala Leu Lys Ala Gln Ala Asn Gly Ala Gln Arg Val Ser Asn
4010 4015 4020

Ala Gln Asp Val Gln His Asn Ala Thr Glu Leu Asn Thr Ala Met
4025 4030 4035

Gly Thr Leu Lys His Ala Ile Ala Asp Lys Thr Asn Thr Leu Ala
4040 4045 4050

Ser Ser Lys Tyr Val Asn Ala Asp Ser Thr Lys Gln Asn Ala Tyr
4055 4060 4065

Thr Thr Lys Val Thr Asn Ala Glu His Ile Ile Ser Gly Thr Pro
4070 4075 4080

Thr Val Val Thr Thr Pro Ser Glu Val Thr Ala Ala Ala Asn Gln
4085 4090 4095

Val Asn Ser Ala Lys Gln Glu Leu Asn Gly Asp Glu Arg Leu Arg
4100 4105 4110

Glu Ala Lys Gln Asn Ala Asn Thr Ala Ile Asp Ala Leu Thr Gln
4115 4120 4125

Leu Asn Thr Pro Gln Lys Ala Lys Leu Lys Glu Gln Val Gly Gln
4130 4135 4140

Ala Asn Arg Leu Glu Asp Val Gln Thr Val Gln Thr Asn Gly Gln
4145 4150 4155

Ala Leu Asn Asn Ala Met Lys Gly Leu Arg Asp Ser Ile Ala Asn
4160 4165 4170

Glu Thr Thr Val Lys Thr Ser Gln Asn Tyr Thr Asp Ala Ser Pro
 4175 4180 4185
 Asn Asn Gln Ser Thr Tyr Asn Ser Ala Val Ser Asn Ala Lys Gly
 4190 4195 4200
 Ile Ile Asn Gln Thr Asn Asn Pro Thr Met Asp Thr Ser Ala Ile
 4205 4210 4215
 Thr Gln Ala Thr Thr Gln Val Asn Asn Ala Lys Asn Gly Leu Asn
 4220 4225 4230
 Gly Ala Glu Asn Leu Arg Asn Ala Gln Asn Thr Ala Lys Gln Asn
 4235 4240 4245
 Leu Asn Thr Leu Ser His Leu Thr Asn Asn Gln Lys Ser Ala Ile
 4250 4255 4260
 Ser Ser Gln Ile Asp Arg Ala Gly His Val Ser Glu Val Thr Ala
 4265 4270 4275
 Thr Lys Asn Ala Ala Thr Glu Leu Asn Thr Gln Met Gly Asn Leu
 4280 4285 4290
 Glu Gln Ala Ile His Asp Gln Asn Thr Val Lys Gln Ser Val Lys
 4295 4300 4305
 Phe Thr Asp Ala Asp Lys Ala Lys Arg Asp Ala Tyr Thr Asn Ala
 4310 4315 4320
 Val Ser Arg Ala Glu Ala Ile Leu Asn Lys Thr Gln Gly Ala Asn
 4325 4330 4335
 Thr Ser Lys Gln Asp Val Glu Ala Ala Ile Gln Asn Val Ser Ser
 4340 4345 4350
 Ala Lys Asn Ala Leu Asn Gly Asp Gln Asn Val Thr Asn Ala Lys
 4355 4360 4365
 Asn Ala Ala Lys Asn Ala Leu Asn Asn Leu Thr Ser Ile Asn Asn
 4370 4375 4380
 Ala Gln Lys Arg Asp Leu Thr Thr Lys Ile Asp Gln Ala Thr Thr
 4385 4390 4395
 Val Ala Gly Val Glu Ala Val Ser Asn Thr Ser Thr Gln Leu Asn
 4400 4405 4410
 Thr Ala Met Ala Asn Leu Gln Asn Gly Ile Asn Asp Lys Thr Asn

4415		4420		4425
Thr Leu Ala Ser Glu Asn Tyr His Asp Ala Asp Ser Asp Lys Lys 4430		4435		4440
Thr Ala Tyr Thr Gln Ala Val Thr Asn Ala Glu Asn Ile Leu Asn 4445		4450		4455
Lys Asn Ser Gly Ser Asn Leu Asp Lys Thr Ala Val Glu Asn Ala 4460		4465		4470
Leu Ser Gln Val Ala Asn Ala Lys Gly Ala Leu Asn Gly Asn His 4475		4480		4485
Asn Leu Glu Gln Ala Lys Ser Asn Ala Asn Thr Thr Ile Asn Gly 4490		4495		4500
Leu Gln His Leu Thr Thr Ala Gln Lys Asp Lys Leu Lys Gln Gln 4505		4510		4515
Val Gln Gln Ala Gln Asn Val Ala Gly Val Asp Thr Val Lys Ser 4520		4525		4530
Ser Ala Asn Thr Leu Asn Gly Ala Met Gly Thr Leu Arg Asn Ser 4535		4540		4545
Ile Gln Asp Asn Thr Ala Thr Lys Asn Gly Gln Asn Tyr Leu Asp 4550		4555		4560
Ala Thr Glu Arg Asn Lys Thr Asn Tyr Asn Asn Ala Val Asp Ser 4565		4570		4575
Ala Asn Gly Val Ile Asn Ala Thr Ser Asn Pro Asn Met Asp Ala 4580		4585		4590
Asn Ala Ile Asn Gln Ile Ala Thr Gln Val Thr Ser Thr Lys Asn 4595		4600		4605
Ala Leu Asp Gly Thr His Asn Leu Thr Gln Ala Lys Gln Thr Ala 4610		4615		4620
Thr Asn Ala Ile Asp Gly Ala Thr Asn Leu Asn Lys Ala Gln Lys 4625		4630		4635
Asp Ala Leu Lys Ala Gln Val Thr Ser Ala Gln Arg Val Ala Asn 4640		4645		4650
Val Thr Ser Ile Gln Gln Thr Ala Asn Glu Leu Asn Thr Ala Met 4655		4660		4665

Gly Gln Leu Gln His Gly Ile Asp Asp Glu Asn Ala Thr Lys Gln
 4670 4675 4680
 Thr Gln Lys Tyr Arg Asp Ala Glu Gln Ser Lys Lys Thr Ala Tyr
 4685 4690 4695
 Asp Gln Ala Val Ala Ala Ala Lys Ala Ile Leu Asn Lys Gln Thr
 4700 4705 4710
 Gly Ser Asn Ser Asp Lys Ala Ala Val Asp Arg Ala Leu Gln Gln
 4715 4720 4725
 Val Thr Ser Thr Lys Asp Ala Leu Asn Gly Asp Ala Lys Leu Ala
 4730 4735 4740
 Glu Ala Lys Ala Ala Ala Lys Gln Asn Leu Gly Thr Leu Asn His
 4745 4750 4755
 Ile Thr Asn Ala Gln Arg Thr Asp Leu Glu Gly Gln Ile Asn Gln
 4760 4765 4770
 Ala Thr Thr Val Asp Gly Val Asn Thr Val Lys Thr Asn Ala Asn
 4775 4780 4785
 Thr Leu Asp Gly Ala Met Asn Ser Leu Gln Gly Ser Ile Asn Asp
 4790 4795 4800
 Lys Asp Ala Thr Leu Arg Asn Gln Asn Tyr Leu Asp Ala Asp Glu
 4805 4810 4815
 Ser Lys Arg Asn Ala Tyr Thr Gln Ala Val Thr Ala Ala Glu Gly
 4820 4825 4830
 Ile Leu Asn Lys Gln Thr Gly Gly Asn Thr Ser Lys Ala Asp Val
 4835 4840 4845
 Asp Asn Ala Leu Asn Ala Val Thr Arg Ala Lys Ala Ala Leu Asn
 4850 4855 4860
 Gly Ala Asp Asn Leu Arg Asn Ala Lys Thr Ser Ala Thr Asn Thr
 4865 4870 4875
 Ile Asp Gly Leu Pro Asn Leu Thr Gln Leu Gln Lys Asp Asn Leu
 4880 4885 4890
 Lys His Gln Val Glu Gln Ala Gln Asn Val Ala Gly Val Asn Gly
 4895 4900 4905

Val Lys Asp Lys Gly Asn Thr Leu Asn Thr Ala Met Gly Ala Leu
 4910 4915 4920
 Arg Thr Ser Ile Gln Asn Asp Asn Thr Thr Lys Thr Ser Gln Asn
 4925 4930 4935
 Tyr Leu Asp Ala Ser Asp Ser Asn Lys Asn Asn Tyr Asn Thr Ala
 4940 4945 4950
 Val Asn Asn Ala Asn Gly Val Ile Asn Ala Thr Asn Asn Pro Asn
 4955 4960 4965
 Met Asp Ala Asn Ala Ile Asn Gly Met Ala Asn Gln Val Asn Thr
 4970 4975 4980
 Thr Lys Ala Ala Leu Asn Gly Ala Gln Asn Leu Ala Gln Ala Lys
 4985 4990 4995
 Thr Asn Ala Thr Asn Thr Ile Asn Asn Ala His Asp Leu Asn Gln
 5000 5005 5010
 Lys Gln Lys Asp Ala Leu Lys Thr Gln Val Asn Asn Ala Gln Arg
 5015 5020 5025
 Val Ser Asp Ala Asn Asn Val Gln His Thr Ala Thr Glu Leu Asn
 5030 5035 5040
 Ser Ala Met Thr Ala Leu Lys Ala Ala Ile Ala Asp Lys Glu Arg
 5045 5050 5055
 Thr Lys Ala Ser Gly Asn Tyr Val Asn Ala Asp Gln Glu Lys Arg
 5060 5065 5070
 Gln Ala Tyr Asp Ser Lys Val Thr Asn Ala Glu Asn Ile Ile Ser
 5075 5080 5085
 Gly Thr Pro Asn Ala Thr Leu Thr Val Asn Asp Val Asn Ser Ala
 5090 5095 5100
 Ala Ser Gln Val Asn Ala Ala Lys Thr Ala Leu Asn Gly Asp Asn
 5105 5110 5115
 Asn Leu Arg Val Ala Lys Glu His Ala Asn Asn Thr Ile Asp Gly
 5120 5125 5130
 Leu Ala Gln Leu Asn Asn Ala Gln Lys Ala Lys Leu Lys Glu Gln
 5135 5140 5145

Val Gln Ser Ala Thr Thr Leu Asp Gly Val Gln Thr Val Lys Asn
 5150 5155 5160

Ser Ser Gln Thr Leu Asn Thr Ala Met Lys Gly Leu Arg Asp Ser
 5165 5170 5175

Ile Ala Asn Glu Ala Thr Ile Lys Ala Gly Gln Asn Tyr Thr Asp
 5180 5185 5190

Ala Ser Pro Asn Asn Arg Asn Glu Tyr Asp Ser Ala Val Thr Ala
 5195 5200 5205

Ala Lys Ala Ile Ile Asn Gln Thr Ser Asn Pro Thr Met Glu Pro
 5210 5215 5220

Asn Thr Ile Thr Gln Val Thr Ser Gln Val Thr Thr Lys Glu Gln
 5225 5230 5235

Ala Leu Asn Gly Ala Arg Asn Leu Ala Gln Ala Lys Thr Thr Ala
 5240 5245 5250

Lys Asn Asn Leu Asn Asn Leu Thr Ser Ile Asn Asn Ala Gln Lys
 5255 5260 5265

Asp Ala Leu Thr Arg Ser Ile Asp Gly Ala Thr Thr Val Ala Gly
 5270 5275 5280

Val Asn Gln Glu Thr Ala Lys Ala Thr Glu Leu Asn Asn Ala Met
 5285 5290 5295

His Ser Leu Gln Asn Gly Ile Asn Asp Glu Thr Gln Thr Lys Gln
 5300 5305 5310

Thr Gln Lys Tyr Leu Asp Ala Glu Pro Ser Lys Lys Ser Ala Tyr
 5315 5320 5325

Asp Gln Ala Val Asn Ala Ala Lys Ala Ile Leu Thr Lys Ala Ser
 5330 5335 5340

Gly Gln Asn Val Asp Lys Ala Ala Val Glu Gln Ala Leu Gln Asn
 5345 5350 5355

Val Asn Ser Thr Lys Thr Ala Leu Asn Gly Asp Ala Lys Leu Asn
 5360 5365 5370

Glu Ala Lys Ala Ala Ala Lys Gln Thr Leu Gly Thr Leu Thr His
 5375 5380 5385

Ile Asn Asn Ala Gln Arg Thr Ala Leu Asp Asn Glu Ile Thr Gln

5390		5395		5400
Ala Thr Asn Val Glu Gly Val Asn Thr Val Lys Ala Lys Ala Gln 5405		5410		5415
Gln Leu Asp Gly Ala Met Gly Gln Leu Glu Thr Ser Ile Arg Asp 5420		5425		5430
Lys Asp Thr Thr Leu Gln Ser Gln Asn Tyr Gln Asp Ala Asp Asp 5435		5440		5445
Ala Lys Arg Thr Ala Tyr Ser Gln Ala Val Asn Ala Ala Ala Thr 5450		5455		5460
Ile Leu Asn Lys Thr Ala Gly Gly Asn Thr Pro Lys Ala Asp Val 5465		5470		5475
Glu Arg Ala Met Gln Ala Val Thr Gln Ala Asn Thr Ala Leu Asn 5480		5485		5490
Gly Ile Gln Asn Leu Asp Arg Ala Lys Gln Ala Ala Asn Thr Ala 5495		5500		5505
Ile Thr Asn Ala Ser Asp Leu Asn Thr Lys Gln Lys Glu Ala Leu 5510		5515		5520
Lys Ala Gln Val Thr Ser Ala Gly Arg Val Ser Ala Ala Asn Gly 5525		5530		5535
Val Glu His Thr Ala Thr Glu Leu Asn Thr Ala Met Thr Ala Leu 5540		5545		5550
Lys Arg Ala Ile Ala Asp Lys Ala Glu Thr Lys Ala Ser Gly Asn 5555		5560		5565
Tyr Val Asn Ala Asp Ala Asn Lys Arg Gln Ala Tyr Asp Glu Lys 5570		5575		5580
Val Thr Ala Ala Glu Asn Ile Val Ser Gly Thr Pro Thr Pro Thr 5585		5590		5595
Leu Thr Pro Ala Asp Val Thr Asn Ala Ala Thr Gln Val Thr Asn 5600		5605		5610
Ala Lys Thr Gln Leu Asn Gly Asn His Asn Leu Glu Val Ala Lys 5615		5620		5625
Gln Asn Ala Asn Thr Ala Ile Asp Gly Leu Thr Ser Leu Asn Gly 5630		5635		5640

Pro Gln Lys Ala Lys Leu Lys Glu Gln Val Gly Gln Ala Thr Thr
 5645 5650 5655

 Leu Pro Asn Val Gln Thr Val Arg Asp Asn Ala Gln Thr Leu Asn
 5660 5665 5670

 Thr Ala Met Lys Gly Leu Arg Asp Ser Ile Ala Asn Glu Ala Thr
 5675 5680 5685

 Ile Lys Ala Gly Gln Asn Tyr Thr Asp Ala Ser Gln Asn Lys Gln
 5690 5695 5700

 Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Val Thr Ala Ala Lys Ala Ile Ile Gly
 5705 5710 5715

 Gln Thr Thr Ser Pro Ser Met Asn Ala Gln Glu Ile Asn Gln Ala
 5720 5725 5730

 Lys Asp Gln Val Thr Ala Lys Gln Gln Ala Leu Asn Gly Gln Glu
 5735 5740 5745

 Asn Leu Arg Thr Ala Gln Thr Asn Ala Lys Gln His Leu Asn Gly
 5750 5755 5760

 Leu Ser Asp Leu Thr Asp Ala Gln Lys Asp Ala Val Lys Arg Gln
 5765 5770 5775

 Ile Glu Gly Ala Thr His Val Asn Glu Val Thr Gln Ala Gln Asn
 5780 5785 5790

 Asn Ala Asp Ala Leu Asn Thr Ala Met Thr Asn Leu Lys Asn Gly
 5795 5800 5805

 Ile Gln Asp Gln Asn Thr Ile Lys Gln Gly Val Asn Phe Thr Asp
 5810 5815 5820

 Ala Asp Glu Ala Lys Arg Asn Ala Tyr Thr Asn Ala Val Thr Gln
 5825 5830 5835

 Ala Glu Gln Ile Leu Asn Lys Ala Gln Gly Pro Asn Thr Ser Lys
 5840 5845 5850

 Asp Gly Val Glu Thr Ala Leu Glu Asn Val Gln Arg Ala Lys Asn
 5855 5860 5865

 Glu Leu Asn Gly Asn Gln Asn Val Ala Asn Ala Lys Thr Thr Ala
 5870 5875 5880

Lys Asn Ala Leu Asn Asn Leu Thr Ser Ile Asn Asn Ala Gln Lys
 5885 5890 5895
 Glu Ala Leu Lys Ser Gln Ile Glu Gly Ala Thr Thr Val Ala Gly
 5900 5905 5910
 Val Asn Gln Val Ser Thr Thr Ala Ser Glu Leu Asn Thr Ala Met
 5915 5920 5925
 Ser Asn Leu Gln Asn Gly Ile Asn Asp Glu Ala Ala Thr Lys Ala
 5930 5935 5940
 Ala Gln Lys Tyr Thr Asp Ala Asp Arg Glu Lys Gln Thr Ala Tyr
 5945 5950 5955
 Asn Asp Ala Val Thr Ala Ala Lys Thr Leu Leu Asp Lys Thr Ala
 5960 5965 5970
 Gly Ser Asn Asp Asn Lys Ala Ala Val Glu Gln Ala Leu Gln Arg
 5975 5980 5985
 Val Asn Thr Ala Lys Thr Ala Leu Asn Gly Asp Glu Arg Leu Asn
 5990 5995 6000
 Glu Ala Lys Asn Thr Ala Lys Gln Gln Val Ala Thr Met Ser His
 6005 6010 6015
 Leu Thr Asp Ala Gln Lys Ala Asn Leu Thr Ser Gln Ile Glu Ser
 6020 6025 6030
 Gly Thr Thr Val Ala Gly Val Gln Gly Ile Gln Ala Asn Ala Gly
 6035 6040 6045
 Thr Leu Asp Gln Ala Met Asn Gln Leu Arg Gln Ser Ile Ala Ser
 6050 6055 6060
 Lys Asp Ala Thr Lys Ser Ser Glu Asp Tyr Gln Asp Ala Asn Ala
 6065 6070 6075
 Asp Leu Gln Asn Ala Tyr Asn Asp Ala Val Thr Asn Ala Glu Gly
 6080 6085 6090
 Ile Ile Ser Ala Thr Asn Asn Pro Glu Met Asn Pro Asp Thr Ile
 6095 6100 6105
 Asn Gln Lys Ala Ser Gln Val Asn Ser Ala Lys Ser Ala Leu Asn
 6110 6115 6120

Gly Asp Glu Lys Leu Ala Ala Ala Lys Gln Thr Ala Lys Ser Asp
 6125 6130 6135
 Ile Gly Arg Leu Thr Asp Leu Asn Asn Ala Gln Arg Thr Ala Ala
 6140 6145 6150
 Asn Ala Glu Val Asp Gln Ala Pro Asn Leu Ala Ala Val Thr Ala
 6155 6160 6165
 Ala Lys Asn Lys Ala Thr Ser Leu Asn Thr Ala Met Gly Asn Leu
 6170 6175 6180
 Lys His Ala Leu Ala Glu Lys Asp Asn Thr Lys Arg Ser Val Asn
 6185 6190 6195
 Tyr Thr Asp Ala Asp Gln Pro Lys Gln Gln Ala Tyr Asp Thr Ala
 6200 6205 6210
 Val Thr Gln Ala Glu Ala Ile Thr Asn Ala Asn Gly Ser Asn Ala
 6215 6220 6225
 Asn Glu Thr Gln Val Gln Ala Ala Leu Asn Gln Leu Asn Gln Ala
 6230 6235 6240
 Lys Asn Asp Leu Asn Gly Asp Asn Lys Val Ala Gln Ala Lys Glu
 6245 6250 6255
 Ser Ala Lys Arg Ala Leu Ala Ser Tyr Ser Asn Leu Asn Asn Ala
 6260 6265 6270
 Gln Ser Thr Ala Ala Ile Ser Gln Ile Asp Asn Ala Thr Thr Val
 6275 6280 6285
 Ala Gly Val Thr Ala Ala Gln Asn Thr Ala Asn Glu Leu Asn Thr
 6290 6295 6300
 Ala Met Gly Gln Leu Gln Asn Gly Ile Asn Asp Gln Asn Thr Val
 6305 6310 6315
 Lys Gln Gln Val Asn Phe Thr Asp Ala Asp Gln Gly Lys Lys Asp
 6320 6325 6330
 Ala Tyr Thr Asn Ala Val Thr Asn Ala Gln Gly Ile Leu Asp Lys
 6335 6340 6345
 Ala His Gly Gln Asn Met Thr Lys Ala Gln Val Glu Ala Ala Leu
 6350 6355 6360
 Asn Gln Val Thr Thr Ala Lys Asn Ala Leu Asn Gly Asp Ala Asn

6365		6370		6375
Val Arg Gln Ala Lys Ser Asp Ala Lys Ala Asn Leu Gly Thr Leu 6380		6385		6390
Thr His Leu Asn Asn Ala Gln Lys Gln Asp Leu Thr Ser Gln Ile 6395		6400		6405
Glu Gly Ala Thr Thr Val Asn Gly Val Asn Gly Val Lys Thr Lys 6410		6415		6420
Ala Gln Asp Leu Asp Gly Ala Met Gln Arg Leu Gln Ser Ala Ile 6425		6430		6435
Ala Asn Lys Asp Gln Thr Lys Ala Ser Glu Asn Tyr Ile Asp Ala 6440		6445		6450
Asp Pro Thr Lys Lys Thr Ala Phe Asp Asn Ala Ile Thr Gln Ala 6455		6460		6465
Glu Ser Tyr Leu Asn Lys Asp His Gly Ala Asn Lys Asp Lys Gln 6470		6475		6480
Ala Val Glu Gln Ala Ile Gln Ser Val Thr Ser Thr Glu Asn Ala 6485		6490		6495
Leu Asn Gly Asp Ala Asn Leu Gln Arg Ala Lys Thr Glu Ala Ile 6500		6505		6510
Gln Ala Ile Asp Asn Leu Thr His Leu Asn Thr Pro Gln Lys Thr 6515		6520		6525
Ala Leu Lys Gln Gln Val Asn Ala Ala Gln Arg Val Ser Gly Val 6530		6535		6540
Thr Asp Leu Lys Asn Ser Ala Thr Ser Leu Asn Asn Ala Met Asp 6545		6550		6555
Gln Leu Lys Gln Ala Ile Ala Asp His Asp Thr Ile Val Ala Ser 6560		6565		6570
Gly Asn Tyr Thr Asn Ala Ser Pro Asp Lys Gln Gly Ala Tyr Thr 6575		6580		6585
Asp Ala Tyr Asn Ala Ala Lys Asn Ile Val Asn Gly Ser Pro Asn 6590		6595		6600
Val Ile Thr Asn Ala Ala Asp Val Thr Ala Ala Thr Gln Arg Val 6605		6610		6615

Asn Asn Ala Glu Thr Gly Leu Asn Gly Asp Thr Asn Leu Ala Thr
 6620 6625 6630
 Ala Lys Gln Gln Ala Lys Asp Ala Leu Arg Gln Met Thr His Leu
 6635 6640 6645
 Ser Asp Ala Gln Lys Gln Ser Ile Thr Gly Gln Ile Asp Ser Ala
 6650 6655 6660
 Thr Gln Val Thr Gly Val Gln Ser Val Lys Asp Asn Ala Thr Asn
 6665 6670 6675
 Leu Asp Asn Ala Met Asn Gln Leu Arg Asn Ser Ile Ala Asn Lys
 6680 6685 6690
 Asp Asp Val Lys Ala Ser Gln Pro Tyr Val Asp Ala Asp Arg Asp
 6695 6700 6705
 Lys Gln Asn Ala Tyr Asn Thr Ala Val Thr Asn Ala Glu Asn Ile
 6710 6715 6720
 Ile Asn Ala Thr Ser Gln Pro Thr Leu Asp Pro Ser Ala Val Thr
 6725 6730 6735
 Gln Ala Ala Asn Gln Val Ser Thr Asn Lys Thr Ala Leu Asn Gly
 6740 6745 6750
 Ala Gln Asn Leu Ala Asn Lys Lys Gln Glu Thr Thr Ala Asn Ile
 6755 6760 6765
 Asn Gln Leu Ser His Leu Asn Asn Ala Gln Lys Gln Asp Leu Asn
 6770 6775 6780
 Thr Gln Val Thr Asn Ala Pro Asn Ile Ser Thr Val Asn Gln Val
 6785 6790 6795
 Lys Thr Lys Ala Glu Gln Leu Asp Gln Ala Met Glu Arg Leu Ile
 6800 6805 6810
 Asn Gly Ile Gln Asp Lys Asp Gln Val Lys Gln Ser Val Asn Phe
 6815 6820 6825
 Thr Asp Ala Asp Pro Glu Lys Gln Thr Ala Tyr Asn Asn Ala Val
 6830 6835 6840
 Thr Ala Ala Glu Asn Ile Ile Asn Gln Ala Asn Gly Thr Asn Ala
 6845 6850 6855

Asn Gln Ser Gln Val Glu Ala Ala Leu Ser Thr Val Thr Thr Thr
 6860 6865 6870
 Lys Gln Ala Leu Asn Gly Asp Arg Lys Val Thr Asp Ala Lys Asn
 6875 6880 6885
 Asn Ala Asn Gln Thr Leu Ser Thr Leu Asp Asn Leu Asn Asn Ala
 6890 6895 6900
 Gln Lys Gly Ala Val Thr Gly Asn Ile Asn Gln Ala His Thr Val
 6905 6910 6915
 Ala Glu Val Thr Gln Ala Ile Gln Thr Ala Gln Glu Leu Asn Thr
 6920 6925 6930
 Ala Met Gly Asn Leu Lys Asn Ser Leu Asn Asp Lys Asp Thr Thr
 6935 6940 6945
 Leu Gly Ser Gln Asn Phe Ala Asp Ala Asp Pro Glu Lys Lys Asn
 6950 6955 6960
 Ala Tyr Asn Glu Ala Val His Asn Ala Glu Asn Ile Leu Asn Lys
 6965 6970 6975
 Ser Thr Gly Thr Asn Val Pro Lys Asp Gln Val Glu Ala Ala Met
 6980 6985 6990
 Asn Gln Val Asn Ala Thr Lys Ala Ala Leu Asn Gly Thr Gln Asn
 6995 7000 7005
 Leu Glu Lys Ala Lys Gln His Ala Asn Thr Ala Ile Asp Gly Leu
 7010 7015 7020
 Ser His Leu Thr Asn Ala Gln Lys Glu Ala Leu Lys Gln Leu Val
 7025 7030 7035
 Gln Gln Ser Thr Thr Val Ala Glu Ala Gln Gly Asn Glu Gln Lys
 7040 7045 7050
 Ala Asn Asn Val Asp Ala Ala Met Asp Lys Leu Arg Gln Ser Ile
 7055 7060 7065
 Ala Asp Asn Ala Thr Thr Lys Gln Asn Gln Asn Tyr Thr Asp Ala
 7070 7075 7080
 Ser Gln Asn Lys Lys Asp Ala Tyr Asn Asn Ala Val Thr Thr Ala
 7085 7090 7095

Gln Gly Ile Ile Asp Gln Thr Thr Ser Pro Thr Leu Asp Pro Thr
 7100 7105 7110
 Val Ile Asn Gln Ala Ala Gly Gln Val Ser Thr Thr Lys Asn Ala
 7115 7120 7125
 Leu Asn Gly Asn Glu Asn Leu Glu Ala Ala Lys Gln Gln Ala Ser
 7130 7135 7140
 Gln Ser Leu Gly Ser Leu Asp Asn Leu Asn Asn Ala Gln Lys Gln
 7145 7150 7155
 Thr Val Thr Asp Gln Ile Asn Gly Ala His Thr Val Asp Glu Ala
 7160 7165 7170
 Asn Gln Ile Lys Gln Asn Ala Gln Asn Leu Asn Thr Ala Met Gly
 7175 7180 7185
 Asn Leu Lys Gln Ala Ile Ala Asp Lys Asp Ala Thr Lys Ala Thr
 7190 7195 7200
 Val Asn Phe Thr Asp Ala Asp Gln Ala Lys Gln Gln Ala Tyr Asn
 7205 7210 7215
 Thr Ala Val Thr Asn Ala Glu Asn Ile Ser Lys Ala Asn Gly Asn
 7220 7225 7230
 Ala Thr Gln Ala Glu Val Glu Gln Ala Ile Lys Gln Val Asn Ala
 7235 7240 7245
 Ala Lys Gln Ala Leu Asn Gly Asn Ala Asn Val Gln His Ala Lys
 7250 7255 7260
 Asp Glu Ala Thr Ala Leu Ile Asn Ser Ser Asn Asp Leu Asn Gln
 7265 7270 7275
 Ala Gln Lys Asp Ala Leu Lys Gln Gln Val Gln Asn Ala Thr Thr
 7280 7285 7290
 Val Ala Gly Val Asn Asn Val Lys Gln Thr Ala Gln Glu Leu Asn
 7295 7300 7305
 Asn Ala Met Thr Gln Leu Lys Gln Gly Ile Ala Asp Lys Glu Gln
 7310 7315 7320
 Thr Lys Ala Asp Gly Asn Phe Val Asn Ala Asp Pro Asp Lys Gln
 7325 7330 7335
 Asn Ala Tyr Asn Gln Ala Val Ala Lys Ala Glu Ala Leu Ile Ser

7340		7345		7350
Ala Thr	Pro Asp Val Val	Val Thr Pro Ser Glu	Ile Thr Ala Ala	
7355		7360	7365	
Leu Asn	Lys Val Thr Gln	Ala Lys Asn Asp Leu	Asn Gly Asn Thr	
7370		7375	7380	
Asn Leu	Ala Thr Ala Lys	Gln Asn Val Gln His	Ala Ile Asp Gln	
7385		7390	7395	
Leu Pro	Asn Leu Asn Gln	Ala Gln Arg Asp Glu	Tyr Ser Lys Gln	
7400		7405	7410	
Ile Thr	Gln Ala Thr Leu	Val Pro Asn Val Asn	Ala Ile Gln Gln	
7415		7420	7425	
Ala Ala	Thr Thr Leu Asn	Asp Ala Met Thr Gln	Leu Lys Gln Gly	
7430		7435	7440	
Ile Ala	Asn Lys Ala Gln	Ile Lys Gly Ser Glu	Asn Tyr His Asp	
7445		7450	7455	
Ala Asp	Thr Asp Lys Gln	Thr Ala Tyr Asp Asn	Ala Val Thr Lys	
7460		7465	7470	
Ala Glu	Glu Leu Leu Lys	Gln Thr Thr Asn Pro	Thr Met Asp Pro	
7475		7480	7485	
Asn Thr	Ile Gln Gln Ala	Leu Thr Lys Val Asn	Asp Thr Asn Gln	
7490		7495	7500	
Ala Leu	Asn Gly Asn Gln	Lys Leu Ala Asp Ala	Lys Gln Asp Ala	
7505		7510	7515	
Lys Thr	Thr Leu Gly Thr	Leu Asp His Leu Asn	Asp Ala Gln Lys	
7520		7525	7530	
Gln Ala	Leu Thr Thr Gln	Val Glu Gln Ala Pro	Asp Ile Ala Thr	
7535		7540	7545	
Val Asn	Asn Val Lys Gln	Asn Ala Gln Asn Leu	Asn Asn Ala Met	
7550		7555	7560	
Thr Asn	Leu Asn Asn Ala	Leu Gln Asp Lys Thr	Glu Thr Leu Asn	
7565		7570	7575	
Ser Ile	Asn Phe Thr Asp	Ala Asp Gln Ala Lys	Lys Asp Ala Tyr	
7580		7585	7590	

Thr Asn Ala Val Ser His Ala Glu Gly Ile Leu Ser Lys Ala Asn
 7595 7600 7605

Gly Ser Asn Ala Ser Gln Thr Glu Val Glu Gln Ala Met Gln Arg
 7610 7615 7620

Val Asn Glu Ala Lys Gln Ala Leu Asn Gly Asn Asp Asn Val Gln
 7625 7630 7635

Arg Ala Lys Asp Ala Ala Lys Gln Val Ile Thr Asn Ala Asn Asp
 7640 7645 7650

Leu Asn Gln Ala Gln Lys Asp Ala Leu Lys Gln Gln Val Asp Ala
 7655 7660 7665

Ala Gln Thr Val Ala Asn Val Asn Thr Ile Lys Gln Thr Ala Gln
 7670 7675 7680

Asp Leu Asn Gln Ala Met Thr Gln Leu Lys Gln Gly Ile Ala Asp
 7685 7690 7695

Lys Asp Gln Thr Lys Ala Asn Gly Asn Phe Val Asn Ala Asp Thr
 7700 7705 7710

Asp Lys Gln Asn Ala Tyr Asn Asn Ala Val Ala His Ala Glu Gln
 7715 7720 7725

Ile Ile Ser Gly Thr Pro Asn Ala Asn Val Asp Pro Gln Gln Val
 7730 7735 7740

Ala Gln Ala Leu Gln Gln Val Asn Gln Ala Lys Gly Asp Leu Asn
 7745 7750 7755

Gly Asn His Asn Leu Gln Val Ala Lys Asp Asn Ala Asn Thr Ala
 7760 7765 7770

Ile Asp Gln Leu Pro Asn Leu Asn Gln Pro Gln Lys Thr Ala Leu
 7775 7780 7785

Lys Asp Gln Val Ser His Ala Glu Leu Val Thr Gly Val Asn Ala
 7790 7795 7800

Ile Lys Gln Asn Ala Asp Ala Leu Asn Asn Ala Met Gly Thr Leu
 7805 7810 7815

Lys Gln Gln Ile Gln Ala Asn Ser Gln Val Pro Gln Ser Val Asp
 7820 7825 7830

Phe Thr Gln Ala Asp Gln Asp Lys Gln Gln Ala Tyr Asn Asn Ala
 7835 7840 7845
 Ala Asn Gln Ala Gln Gln Ile Ala Asn Gly Ile Pro Thr Pro Val
 7850 7855 7860
 Leu Thr Pro Asp Thr Val Thr Gln Ala Val Thr Thr Met Asn Gln
 7865 7870 7875
 Ala Lys Asp Ala Leu Asn Gly Asp Glu Lys Leu Ala Gln Ala Lys
 7880 7885 7890
 Gln Glu Ala Leu Ala Asn Leu Asp Thr Leu Arg Asp Leu Asn Gln
 7895 7900 7905
 Pro Gln Arg Asp Ala Leu Arg Asn Gln Ile Asn Gln Ala Gln Ala
 7910 7915 7920
 Leu Ala Thr Val Glu Gln Thr Lys Gln Asn Ala Gln Asn Val Asn
 7925 7930 7935
 Thr Ala Met Ser Asn Leu Lys Gln Gly Ile Ala Asn Lys Asp Thr
 7940 7945 7950
 Val Lys Ala Ser Glu Asn Tyr His Asp Ala Asp Ala Asp Lys Gln
 7955 7960 7965
 Thr Ala Tyr Thr Asn Ala Val Ser Gln Ala Glu Gly Ile Ile Asn
 7970 7975 7980
 Gln Thr Thr Asn Pro Thr Leu Asn Pro Asp Glu Ile Thr Arg Ala
 7985 7990 7995
 Leu Thr Gln Val Thr Asp Ala Lys Asn Gly Leu Asn Gly Glu Ala
 8000 8005 8010
 Lys Leu Ala Thr Glu Lys Gln Asn Ala Lys Asp Ala Val Ser Gly
 8015 8020 8025
 Met Thr His Leu Asn Asp Ala Gln Lys Gln Ala Leu Lys Gly Gln
 8030 8035 8040
 Ile Asp Gln Ser Pro Glu Ile Ala Thr Val Asn Gln Val Lys Gln
 8045 8050 8055
 Thr Ala Thr Ser Leu Asp Gln Ala Met Asp Gln Leu Ser Gln Ala
 8060 8065 8070

Ile Asn Asp Lys Ala Gln Thr Leu Ala Asp Gly Asn Tyr Leu Asn
 8075 8080 8085
 Ala Asp Pro Asp Lys Gln Asn Ala Tyr Lys Gln Ala Val Ala Lys
 8090 8095 8100
 Ala Glu Ala Leu Leu Asn Lys Gln Ser Gly Thr Asn Glu Val Gln
 8105 8110 8115
 Ala Gln Val Glu Ser Ile Thr Asn Glu Val Asn Ala Ala Lys Gln
 8120 8125 8130
 Ala Leu Asn Gly Asn Asp Asn Leu Ala Asn Ala Lys Gln Gln Ala
 8135 8140 8145
 Lys Gln Gln Leu Ala Asn Leu Thr His Leu Asn Asp Ala Gln Lys
 8150 8155 8160
 Gln Ser Phe Glu Ser Gln Ile Thr Gln Ala Pro Leu Val Thr Asp
 8165 8170 8175
 Val Thr Thr Ile Asn Gln Lys Ala Gln Thr Leu Asp His Ala Met
 8180 8185 8190
 Glu Leu Leu Arg Asn Ser Val Ala Asp Asn Gln Thr Thr Leu Ala
 8195 8200 8205
 Ser Glu Asp Tyr His Asp Ala Thr Ala Gln Arg Gln Asn Asp Tyr
 8210 8215 8220
 Asn Gln Ala Val Thr Ala Ala Asn Asn Ile Ile Asn Gln Thr Thr
 8225 8230 8235
 Ser Pro Thr Met Asn Pro Asp Asp Val Asn Gly Ala Thr Thr Gln
 8240 8245 8250
 Val Asn Asn Thr Lys Val Ala Leu Asp Gly Asp Glu Asn Leu Ala
 8255 8260 8265
 Ala Ala Lys Gln Gln Ala Asn Asn Arg Leu Asp Gln Leu Asp His
 8270 8275 8280
 Leu Asn Asn Ala Gln Lys Gln Gln Leu Gln Ser Gln Ile Thr Gln
 8285 8290 8295
 Ser Ser Asp Ile Ala Ala Val Asn Gly His Lys Gln Thr Ala Glu
 8300 8305 8310
 Ser Leu Asn Thr Ala Met Gly Asn Leu Ile Asn Ala Ile Ala Asp

8315		8320		8325
His Gln Ala Val Glu Gln Arg Gly Asn Phe Ile Asn Ala Asp Thr 8330		8335		8340
Asp Lys Gln Thr Ala Tyr Asn Thr Ala Val Asn Glu Ala Ala Ala 8345		8350		8355
Met Ile Asn Lys Gln Thr Gly Gln Asn Ala Asn Gln Thr Glu Val 8360		8365		8370
Glu Gln Ala Ile Thr Lys Val Gln Thr Thr Leu Gln Ala Leu Asn 8375		8380		8385
Gly Asp His Asn Leu Gln Val Ala Lys Thr Asn Ala Thr Gln Ala 8390		8395		8400
Ile Asp Ala Leu Thr Ser Leu Asn Asp Pro Gln Lys Thr Ala Leu 8405		8410		8415
Lys Asp Gln Val Thr Ala Ala Thr Leu Val Thr Ala Val His Gln 8420		8425		8430
Ile Glu Gln Asn Ala Asn Thr Leu Asn Gln Ala Met His Gly Leu 8435		8440		8445
Arg Gln Ser Ile Gln Asp Asn Ala Ala Thr Lys Ala Asn Ser Lys 8450		8455		8460
Tyr Ile Asn Glu Asp Gln Pro Glu Gln Gln Asn Tyr Asp Gln Ala 8465		8470		8475
Val Gln Ala Ala Asn Asn Ile Ile Asn Glu Gln Thr Ala Thr Leu 8480		8485		8490
Asp Asn Asn Ala Ile Asn Gln Ala Ala Thr Thr Val Asn Thr Thr 8495		8500		8505
Lys Ala Ala Leu His Gly Asp Val Lys Leu Gln Asn Asp Lys Asp 8510		8515		8520
His Ala Lys Gln Thr Val Ser Gln Leu Ala His Leu Asn Asn Ala 8525		8530		8535
Gln Lys His Met Glu Asp Thr Leu Ile Asp Ser Glu Thr Thr Arg 8540		8545		8550
Thr Ala Val Lys Gln Asp Leu Thr Glu Ala Gln Ala Leu Asp Gln 8555		8560		8565

Leu Met Asp Ala Leu Gln Gln Ser Ile Ala Asp Lys Asp Ala Thr
 8570 8575 8580
 Arg Ala Ser Ser Ala Tyr Val Asn Ala Glu Pro Asn Lys Lys Gln
 8585 8590 8595
 Ser Tyr Asp Glu Ala Val Gln Asn Ala Glu Ser Ile Ile Ala Gly
 8600 8605 8610
 Leu Asn Asn Pro Thr Ile Asn Lys Gly Asn Val Ser Ser Ala Thr
 8615 8620 8625
 Gln Ala Val Ile Ser Ser Lys Asn Ala Leu Asp Gly Val Glu Arg
 8630 8635 8640
 Leu Ala Gln Asp Lys Gln Thr Ala Gly Asn Ser Leu Asn His Leu
 8645 8650 8655
 Asp Gln Leu Thr Pro Ala Gln Gln Gln Ala Leu Glu Asn Gln Ile
 8660 8665 8670
 Asn Asn Ala Thr Thr Arg Gly Glu Val Ala Gln Lys Leu Thr Glu
 8675 8680 8685
 Ala Gln Ala Leu Asn Gln Ala Met Glu Ala Leu Arg Asn Ser Ile
 8690 8695 8700
 Gln Asp Gln Gln Gln Thr Glu Ala Gly Ser Lys Phe Ile Asn Glu
 8705 8710 8715
 Asp Lys Pro Gln Lys Asp Ala Tyr Gln Ala Ala Val Gln Asn Ala
 8720 8725 8730
 Lys Asp Leu Ile Asn Gln Thr Asn Asn Pro Thr Leu Asp Lys Ala
 8735 8740 8745
 Gln Val Glu Gln Leu Thr Gln Ala Val Asn Gln Ala Lys Asp Asn
 8750 8755 8760
 Leu His Gly Asp Gln Lys Leu Ala Asp Asp Lys Gln His Ala Val
 8765 8770 8775
 Thr Asp Leu Asn Gln Leu Asn Gly Leu Asn Asn Pro Gln Arg Gln
 8780 8785 8790
 Ala Leu Glu Ser Gln Ile Asn Asn Ala Ala Thr Arg Gly Glu Val
 8795 8800 8805

Ala Gln Lys Leu Ala Glu Ala Lys Ala Leu Asp Gln Ala Met Gln
8810 8815 8820

Ala Leu Arg Asn Ser Ile Gln Asp Gln Gln Gln Thr Glu Ser Gly
8825 8830 8835

Ser Lys Phe Ile Asn Glu Asp Lys Pro Gln Lys Asp Ala Tyr Gln
8840 8845 8850

Ala Ala Val Gln Asn Ala Lys Asp Leu Ile Asn Gln Thr Gly Asn
8855 8860 8865

Pro Thr Leu Asp Lys Ser Gln Val Glu Gln Leu Thr Gln Ala Val
8870 8875 8880

Thr Thr Ala Lys Asp Asn Leu His Gly Asp Gln Lys Leu Ala Arg
8885 8890 8895

Asp Gln Gln Gln Ala Val Thr Thr Val Asn Ala Leu Pro Asn Leu
8900 8905 8910

Asn His Ala Gln Gln Gln Ala Leu Thr Asp Ala Ile Asn Ala Ala
8915 8920 8925

Pro Thr Arg Thr Glu Val Ala Gln His Val Gln Thr Ala Thr Glu
8930 8935 8940

Leu Asp His Ala Met Glu Thr Leu Lys Asn Lys Val Asp Gln Val
8945 8950 8955

Asn Thr Asp Lys Ala Gln Pro Asn Tyr Thr Glu Ala Ser Thr Asp
8960 8965 8970

Lys Lys Glu Ala Val Asp Gln Ala Leu Gln Ala Ala Glu Ser Ile
8975 8980 8985

Thr Asp Pro Thr Asn Gly Ser Asn Ala Asn Lys Asp Ala Val Asp
8990 8995 9000

Gln Val Leu Thr Lys Leu Gln Glu Lys Glu Asn Glu Leu Asn Gly
9005 9010 9015

Asn Glu Arg Val Ala Glu Ala Lys Thr Gln Ala Lys Gln Thr Ile
9020 9025 9030

Asp Gln Leu Thr His Leu Asn Ala Asp Gln Ile Ala Thr Ala Lys
9035 9040 9045

Gln Asn Ile Asp Gln Ala Thr Lys Leu Gln Pro Ile Ala Glu Leu
 9050 9055 9060

Val Asp Gln Ala Thr Gln Leu Asn Gln Ser Met Asp Gln Leu Gln
 9065 9070 9075

Gln Ala Val Asn Glu His Ala Asn Val Glu Gln Thr Val Asp Tyr
 9080 9085 9090

Thr Gln Ala Asp Ser Asp Lys Gln Asn Ala Tyr Lys Gln Ala Ile
 9095 9100 9105

Ala Asp Ala Glu Asn Val Leu Lys Gln Asn Ala Asn Lys Gln Gln
 9110 9115 9120

Val Asp Gln Ala Leu Gln Asn Ile Leu Asn Ala Lys Gln Ala Leu
 9125 9130 9135

Asn Gly Asp Glu Arg Val Ala Leu Ala Lys Thr Asn Gly Lys His
 9140 9145 9150

Asp Ile Asp Gln Leu Asn Ala Leu Asn Asn Ala Gln Gln Asp Gly
 9155 9160 9165

Phe Lys Gly Arg Ile Asp Gln Ser Asn Asp Leu Asn Gln Ile Gln
 9170 9175 9180

Gln Ile Val Asp Glu Ala Lys Ala Leu Asn Arg Ala Met Asp Gln
 9185 9190 9195

Leu Ser Gln Glu Ile Thr Asp Asn Glu Gly Arg Thr Lys Gly Ser
 9200 9205 9210

Thr Asn Tyr Val Asn Ala Asp Thr Gln Val Lys Gln Val Tyr Asp
 9215 9220 9225

Glu Thr Val Asp Lys Ala Lys Gln Ala Leu Asp Lys Ser Thr Gly
 9230 9235 9240

Gln Asn Leu Thr Ala Lys Gln Val Ile Lys Leu Asn Asp Ala Val
 9245 9250 9255

Thr Ala Ala Lys Lys Ala Leu Asn Gly Glu Glu Arg Leu Asn Asn
 9260 9265 9270

Arg Lys Ala Glu Ala Leu Gln Arg Leu Asp Gln Leu Thr His Leu
 9275 9280 9285

Asn Asn Ala Gln Arg Gln Leu Ala Ile Gln Gln Ile Asn Asn Ala

9290	9295	9300
Glu Thr Leu Asn Lys Ala Ser Arg Ala Ile Asn Arg Ala Thr Lys 9305	9310	9315
Leu Asp Asn Ala Met Gly Ala Val Gln Gln Tyr Ile Asp Glu Gln 9320	9325	9330
His Leu Gly Val Ile Ser Ser Thr Asn Tyr Ile Asn Ala Asp Asp 9335	9340	9345
Asn Leu Lys Ala Asn Tyr Asp Asn Ala Ile Ala Asn Ala Ala His 9350	9355	9360
Glu Leu Asp Lys Val Gln Gly Asn Ala Ile Ala Lys Ala Glu Ala 9365	9370	9375
Glu Gln Leu Lys Gln Asn Ile Ile Asp Ala Gln Asn Ala Leu Asn 9380	9385	9390
Gly Asp Gln Asn Leu Ala Asn Ala Lys Asp Lys Ala Asn Ala Phe 9395	9400	9405
Val Asn Ser Leu Asn Gly Leu Asn Gln Gln Gln Gln Asp Leu Ala 9410	9415	9420
His Lys Ala Ile Asn Asn Ala Asp Thr Val Ser Asp Val Thr Asp 9425	9430	9435
Ile Val Asn Asn Gln Ile Asp Leu Asn Asp Ala Met Glu Thr Leu 9440	9445	9450
Lys His Leu Val Asp Asn Glu Ile Pro Asn Ala Glu Gln Thr Val 9455	9460	9465
Asn Tyr Gln Asn Ala Asp Asp Asn Ala Lys Thr Asn Phe Asp Asp 9470	9475	9480
Ala Lys Arg Leu Ala Asn Thr Leu Leu Asn Ser Asp Asn Thr Asn 9485	9490	9495
Val Asn Asp Ile Asn Gly Ala Ile Gln Ala Val Asn Asp Ala Ile 9500	9505	9510
His Asn Leu Asn Gly Asp Gln Arg Leu Gln Asp Ala Lys Asp Lys 9515	9520	9525
Ala Ile Gln Ser Ile Asn Gln Ala Leu Ala Asn Lys Leu Lys Glu 9530	9535	9540

Ile Glu Ala Ser Asn Ala Thr Asp Gln Asp Lys Leu Ile Ala Lys
 9545 9550 9555

Asn Lys Ala Glu Glu Leu Ala Asn Ser Ile Ile Asn Asn Ile Asn
 9560 9565 9570

Lys Ala Thr Ser Asn Gln Ala Val Ser Gln Val Gln Thr Ala Gly
 9575 9580 9585

Asn His Ala Ile Glu Gln Val His Ala Asn Glu Ile Pro Lys Ala
 9590 9595 9600

Lys Ile Asp Ala Asn Lys Asp Val Asp Lys Gln Val Gln Ala Leu
 9605 9610 9615

Ile Asp Glu Ile Asp Arg Asn Pro Asn Leu Thr Asp Lys Glu Lys
 9620 9625 9630

Gln Ala Leu Lys Asp Arg Ile Asn Gln Ile Leu Gln Gln Gly His
 9635 9640 9645

Asn Gly Ile Asn Asn Ala Met Thr Lys Glu Glu Ile Glu Gln Ala
 9650 9655 9660

Lys Ala Gln Leu Ala Gln Ala Leu Gln Asp Ile Lys Asp Leu Val
 9665 9670 9675

Lys Ala Lys Glu Asp Ala Lys Gln Asp Val Asp Lys Gln Val Gln
 9680 9685 9690

Ala Leu Ile Asp Glu Ile Asp Gln Asn Pro Asn Leu Thr Asp Lys
 9695 9700 9705

Glu Lys Gln Ala Leu Lys Tyr Arg Ile Asn Gln Ile Leu Gln Gln
 9710 9715 9720

Gly His Asn Asp Ile Asn Asn Ala Leu Thr Lys Glu Glu Ile Glu
 9725 9730 9735

Gln Ala Lys Ala Gln Leu Ala Gln Ala Leu Gln Asp Ile Lys Asp
 9740 9745 9750

Leu Val Lys Ala Lys Glu Asp Ala Lys Asn Ala Ile Lys Ala Leu
 9755 9760 9765

Ala Asn Ala Lys Arg Asp Gln Ile Asn Ser Asn Pro Asp Leu Thr
 9770 9775 9780

Pro Glu Gln Lys Ala Lys Ala Leu Lys Glu Ile Asp Glu Ala Glu
 9785 9790 9795
 Lys Arg Ala Leu Gln Asn Val Glu Asn Ala Gln Thr Ile Asp Gln
 9800 9805 9810
 Leu Asn Arg Gly Leu Asn Leu Gly Leu Asp Asp Ile Arg Asn Thr
 9815 9820 9825
 His Val Trp Glu Val Asp Glu Gln Pro Ala Val Asn Glu Ile Phe
 9830 9835 9840
 Glu Ala Thr Pro Glu Gln Ile Leu Val Asn Gly Glu Leu Ile Val
 9845 9850 9855
 His Arg Asp Asp Ile Ile Thr Glu Gln Asp Ile Leu Ala His Ile
 9860 9865 9870
 Asn Leu Ile Asp Gln Leu Ser Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Ser
 9875 9880 9885
 Thr Ala Thr Ile Ser Asp Ser Leu Thr Ala Lys Val Glu Val Thr
 9890 9895 9900
 Leu Leu Asp Gly Ser Lys Val Ile Val Asn Val Pro Val Lys Val
 9905 9910 9915
 Val Glu Lys Glu Leu Ser Val Val Lys Gln Gln Ala Ile Glu Ser
 9920 9925 9930
 Ile Glu Asn Ala Ala Gln Gln Lys Ile Asn Glu Ile Asn Asn Ser
 9935 9940 9945
 Val Thr Leu Thr Leu Glu Gln Lys Glu Ala Ala Ile Ala Glu Val
 9950 9955 9960
 Asn Lys Leu Lys Gln Gln Ala Ile Asp His Val Asn Asn Ala Pro
 9965 9970 9975
 Asp Val His Ser Val Glu Glu Ile Gln Gln Gln Glu Gln Ala His
 9980 9985 9990
 Ile Glu Gln Phe Asn Pro Glu Gln Phe Thr Ile Glu Gln Ala Lys
 9995 10000 10005
 Ser Asn Ala Ile Lys Ser Ile Glu Asp Ala Ile Gln His Met Ile
 10010 10015 10020

Asp Glu Ile Lys Ala Arg Thr Asp Leu Thr Asp Lys Glu Lys Gln
 10025 10030 10035

Glu Ala Ile Ala Lys Leu Asn Gln Leu Lys Glu Gln Ala Ile Gln
 10040 10045 10050

Ala Ile Gln Arg Ala Gln Ser Ile Asp Glu Ile Ser Glu Gln Leu
 10055 10060 10065

Glu Gln Phe Lys Ala Gln Met Lys Ala Ala Asn Pro Thr Ala Lys
 10070 10075 10080

Glu Leu Ala Lys Arg Lys Gln Glu Ala Ile Ser Arg Ile Lys Asp
 10085 10090 10095

Phe Ser Asn Glu Lys Ile Asn Ser Ile Arg Asn Ser Glu Ile Gly
 10100 10105 10110

Thr Ala Asp Glu Lys Gln Ala Ala Met Asn Gln Ile Asn Glu Ile
 10115 10120 10125

Val Leu Glu Thr Ile Arg Asp Ile Asn Asn Ala His Thr Leu Gln
 10130 10135 10140

Gln Val Glu Ala Ala Leu Asn Asn Gly Ile Ala Arg Ile Ser Ala
 10145 10150 10155

Val Gln Ile Val Thr Ser Asp Arg Ala Lys Gln Ser Ser Ser Thr
 10160 10165 10170

Gly Asn Glu Ser Asn Ser His Leu Thr Ile Gly Tyr Gly Thr Ala
 10175 10180 10185

Asn His Pro Phe Asn Ser Ser Thr Ile Gly His Lys Lys Lys Leu
 10190 10195 10200

Asp Glu Asp Asp Asp Ile Asp Pro Leu His Met Arg His Phe Ser
 10205 10210 10215

Asn Asn Phe Gly Asn Val Ile Lys Asn Ala Ile Gly Val Val Gly
 10220 10225 10230

Ile Ser Gly Leu Leu Ala Ser Phe Trp Phe Phe Ile Ala Lys Arg
 10235 10240 10245

Arg Arg Lys Glu Asp Glu Glu Glu Glu Leu Glu Ile Arg Asp Asn
 10250 10255 10260

Asn Lys Asp Ser Ile Lys Glu Thr Leu Asp Asp Thr Lys His Leu

10265	10270	10275
Pro Leu Leu Phe Ala Lys Arg Arg Arg Lys Glu Asp Glu Glu Asp 10280 10285 10290		
Val Thr Val Glu Glu Lys Asp Ser Leu Asn Asn Gly Glu Ser Leu 10295 10300 10305		
Asp Lys Val Lys His Thr Pro Phe Phe Leu Pro Lys Arg Arg Arg 10310 10315 10320		
Lys Glu Asp Glu Glu Asp Val Glu Val Thr Asn Glu Asn Thr Asp 10325 10330 10335		
Glu Lys Val Leu Lys Asp Asn Glu His Ser Pro Leu Leu Phe Ala 10340 10345 10350		
Lys Arg Arg Lys Asp Lys Glu Glu Asp Val Glu Thr Thr Thr Ser 10355 10360 10365		
Ile Glu Ser Lys Asp Glu Asp Val Pro Leu Leu Leu Ala Lys Lys 10370 10375 10380		
Lys Asn Gln Lys Asp Asn Gln Ser Lys Asp Lys Lys Ser Ala Ser 10385 10390 10395		
Lys Asn Thr Ser Lys Lys Val Ala Ala Lys Lys Lys Lys Lys Lys 10400 10405 10410		
Ala Lys Lys Asn Lys Lys 10415		

<210> 25

<211> 340

<212> PRT

<213> Staphylococcus sp.

<400> 25

Met Lys Lys Lys Leu Leu Val Leu Thr Met Ser Thr Leu Phe Ala Thr 1 5 10 15
Gln Ile Met Asn Ser Asn His Ala Lys Ala Ser Val Thr Glu Ser Val 20 25 30
Asp Lys Lys Phe Val Val Pro Glu Ser Gly Ile Asn Lys Ile Ile Pro 35 40 45
Ala Tyr Asp Glu Phe Lys Asn Ser Pro Lys Val Asn Val Ser Asn Leu 50 55 60

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

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

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

Asn Arg Val Asn Val Ala Thr Asn Asn Pro Ala Ser Gln Gln Val Asp
 115 120 125

Lys His Phe Val Ala Lys Gly Pro Glu Val Asn Arg Phe Ile Thr Gln
 130 135 140

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Pro Arg Val
 340

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

<400> 26

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

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

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

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

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

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

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

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

Met Asn
 130

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

<400> 27

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

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

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

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

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

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

Gln Tyr Leu Leu Glu Arg Lys Lys Ser Gln Tyr Glu Asp Tyr Lys Gln
 100 105 110

Trp Tyr Ala Asn Tyr Lys Lys Glu Asn Pro Arg Thr Asp Leu Lys Met
 115 120 125

Ala Asn Phe His Lys Tyr Asn Leu Glu Glu Leu Ser Met Lys Glu Tyr
 130 135 140

Asn Glu Leu Gln Asp Ala Leu Lys Arg Ala Leu Asp Asp Phe His Arg
 145 150 155 160

Glu Val Lys Asp Ile Lys Asp Lys Asn Ser Asp Leu Lys Thr Phe Asn
 165 170 175

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

Glu Ile Asp Thr Leu Val Val Ser Tyr Tyr Gly Asp Lys Asp Tyr Gly
 195 200 205

Glu His Ala Lys Glu Leu Arg Ala Lys Leu Asp Leu Ile Leu Gly Asp
 210 215 220

Thr Asp Asn Pro His Lys Ile Thr Asn Glu Arg Ile Lys Lys Glu Met
 225 230 235 240

Ile Asp Asp Leu Asn Ser Ile Ile Asp Asp Phe Phe Met Glu Thr Lys
 245 250 255

Gln Asn Arg Pro Lys Ser Ile Thr Lys Tyr Asn Pro Thr Thr His Asn
 260 265 270

Tyr Lys Thr Asn Ser Asp Asn Lys Pro Asn Phe Asp Lys Leu Val Glu
 275 280 285

Glu Thr Lys Lys Ala Val Lys Glu Ala Asp Asp Ser Trp Lys Lys Lys
 290 295 300

Thr Val Lys Lys Tyr Gly Glu Thr Glu Thr Lys Ser Pro Val Val Lys
 305 310 315 320

Glu Glu Lys Lys Val Glu Glu Pro Gln Ala Pro Lys Val Asp Asn Gln
 325 330 335

Gln Glu Val Lys Thr Thr Ala Gly Lys Ala Glu Glu Thr Thr Gln Pro
 340 345 350

Val Ala Gln Pro Leu Val Lys Ile Pro Gln Gly Thr Ile Thr Gly Glu
 355 360 365

Ile Val Lys Gly Pro Glu Tyr Pro Thr Met Glu Asn Lys Thr Val Gln
 370 375 380

Gly Glu Ile Val Gln Gly Pro Asp Phe Leu Thr Met Glu Gln Ser Gly
 385 390 395 400

Pro Ser Leu Ser Asn Asn Tyr Thr Asn Pro Pro Leu Thr Asn Pro Ile
 405 410 415

Leu Glu Gly Leu Glu Gly Ser Ser Ser Lys Leu Glu Ile Lys Pro Gln
 420 425 430

Gly Thr Glu Ser Thr Leu Lys Gly Thr Gln Gly Glu Ser Ser Asp Ile
 435 440 445

Glu Val Lys Pro Gln Ala Thr Glu Thr Thr Glu Ala Ser Gln Tyr Gly
 450 455 460

Pro Arg Pro Gln Phe Asn Lys Thr Pro Lys Tyr Val Lys Tyr Arg Asp
 465 470 475 480

Ala Gly Thr Gly Ile Arg Glu Tyr Asn Asp Gly Thr Phe Gly Tyr Glu
 485 490 495

Ala Arg Pro Arg Phe Asn Lys Pro Ser Glu Thr Asn Ala Tyr Asn Val
 500 505 510

Thr Thr His Ala Asn Gly Gln Val Ser Tyr Gly Ala Arg Pro Thr Tyr
 515 520 525

Lys Lys Pro Ser Glu Thr Asn Ala Tyr Asn Val Thr Thr His Ala Asn
 530 535 540

Gly Gln Val Ser Tyr Gly Ala Arg Pro Thr Gln Asn Lys Pro Ser Lys

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

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

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

Ala Val Gly Asn His Glu Phe Asp Phe Gly Tyr Asp Gln Leu Lys Lys
195 200 205

Leu Glu Gly Met Leu Asp Phe Pro Met Leu Ser Thr Asn Val Tyr Lys
210 215 220

Asp Gly Lys Arg Ala Phe Lys Pro Ser Thr Ile Val Thr Lys Asn Gly
225 230 235 240

Ile Arg Tyr Gly Ile Ile Gly Val Thr Thr Pro Glu Thr Lys Thr Lys
245 250 255

Thr Arg Pro Glu Gly Ile Lys Gly Val Glu Phe Arg Asp Pro Leu Gln
260 265 270

Ser Val Thr Ala Glu Met Met Arg Ile Tyr Lys Asp Val Asp Thr Phe
275 280 285

Val Val Ile Ser His Leu Gly Ile Asp Pro Ser Thr Gln Glu Thr Trp
290 295 300

Arg Gly Asp Tyr Leu Val Lys Gln Leu Ser Gln Asn Pro Gln Leu Lys
305 310 315 320

Lys Arg Ile Thr Val Ile Asp Gly His Ser His Thr Val Leu Gln Asn
325 330 335

Gly Gln Ile Tyr Asn Asn Asp Ala Leu Ala Gln Thr Gly Thr Ala Leu
340 345 350

Ala Asn Ile Gly Lys Ile Thr Phe Asn Tyr Arg Asn Gly Glu Val Ser
355 360 365

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

Pro Asn Lys Ala Leu Ala Glu Gln Ile Asn Gln Ala Asp Gln Thr Phe
385 390 395 400

Arg Ala Gln Thr Ala Glu Val Ile Ile Pro Asn Asn Thr Ile Asp Phe
 405 410 415
 Lys Gly Glu Arg Asp Asp Val Arg Thr Arg Glu Thr Asn Leu Gly Asn
 420 425 430
 Ala Ile Ala Asp Ala Met Glu Ala Tyr Gly Val Lys Asn Phe Ser Lys
 435 440 445
 Lys Thr Asp Phe Ala Val Thr Asn Gly Gly Gly Ile Arg Ala Ser Ile
 450 455 460
 Ala Lys Gly Lys Val Thr Arg Tyr Asp Leu Ile Ser Val Leu Pro Phe
 465 470 475 480
 Gly Asn Thr Ile Ala Gln Ile Asp Val Lys Gly Ser Asp Val Trp Thr
 485 490 495
 Ala Phe Glu His Ser Leu Gly Ala Pro Thr Thr Gln Lys Asp Gly Lys
 500 505 510
 Thr Val Leu Thr Ala Asn Gly Gly Leu Leu His Ile Ser Asp Ser Ile
 515 520 525
 Arg Val Tyr Tyr Asp Ile Asn Lys Pro Ser Gly Lys Arg Ile Asn Ala
 530 535 540
 Ile Gln Ile Leu Asn Lys Glu Thr Gly Lys Phe Glu Asn Ile Asp Leu
 545 550 555 560
 Lys Arg Val Tyr His Val Thr Met Asn Asp Phe Thr Ala Ser Gly Gly
 565 570 575
 Asp Gly Tyr Ser Met Phe Gly Gly Pro Arg Glu Glu Gly Ile Ser Leu
 580 585 590
 Asp Gln Val Leu Ala Ser Tyr Leu Lys Thr Ala Asn Leu Ala Lys Tyr
 595 600 605
 Asp Thr Thr Glu Pro Gln Arg Met Leu Leu Gly Lys Pro Ala Val Ser
 610 615 620
 Glu Gln Pro Ala Lys Gly Gln Gln Gly Ser Lys Gly Ser Lys Ser Gly
 625 630 635 640
 Lys Asp Thr Gln Pro Ile Gly Asp Asp Lys Val Met Asp Pro Ala Lys
 645 650 655
 Lys Pro Ala Pro Gly Lys Val Val Leu Leu Leu Ala His Arg Gly Thr

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

Tyr Leu Glu His Ala Phe Leu Ser Gln Asp Phe Phe Asp Ile Pro Ser
165 170 175

Ile His Ser Asp Leu Asp Asp Ile Leu Val Asn Met Phe Leu Tyr Leu
180 185 190

Pro Asn Phe Phe Gln Asn Gln Asn Ser Glu Asp Asn Met Tyr Leu Ala
195 200 205

Gln Arg Ile Met Tyr Gln Val Asp Asp Ile Leu Lys Glu Asp Met Leu
210 215 220

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

Pro Glu Phe Asp Asp Leu Lys Arg Thr Asp Ala Ser Gln Val Asp Gly
245 250 255

Gln Asp Asp Thr Ser Glu Asp Asp Asp Asn Glu Ser Glu Lys Ala Asp
260 265 270

Ser Lys Ser Ala Asp Ser Glu Ser Lys Gly Gly Ala Tyr Leu Glu Met
275 280 285

Glu Leu His Glu Gly Gln Asn Ser Glu Thr Leu Gly Asn Asp Glu Ala
290 295 300

Arg Glu Gly Asp Ala Thr Asp Asp Met Thr Asp Met Met Thr Lys Lys
305 310 315 320

Gly Lys Gly Ser Asn Asp Thr Leu Asn Arg Glu Glu Gly Asp Ala Val
325 330 335

Gly Gln Ser Gln Ala Phe Gln Leu Asp Gly Val Asn Lys Asn Val Glu
340 345 350

Ile Lys Trp Gln Ile Pro Glu Ile Glu Pro Gln Tyr Val Leu Glu Tyr
355 360 365

Gln Glu Ser Lys Gln Asp Val Gln Tyr Glu Ile Lys Asp Leu Ile Gln
370 375 380

Ile Ile Lys Lys Thr Ile Glu Arg Glu Gln Arg Asp Ala Arg Phe Asn
385 390 395 400

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

Asp Gln Tyr Lys Leu Phe Tyr Lys Lys Gln Asp Leu Ser Lys Ser Phe
420 425 430

Asp Ala Thr Phe Thr Leu Leu Ile Asp Ala Ser Ala Ser Met His Asp
435 440 445

Lys Met Ala Glu Thr Lys Lys Gly Val Val Leu Phe His Glu Thr Leu
450 455 460

Lys Ala Leu Asn Ile Lys His Glu Ile Leu Ser Phe Ser Glu Asp Ala
465 470 475 480

Phe Asp Ser Asp Glu His Ala Gln Pro Asn Ile Ile Asn Glu Ile Ile
485 490 495

Asn Tyr Asp Tyr Ser Thr Phe Glu Lys Asp Gly Pro Arg Ile Met Ala
500 505 510

Leu Glu Pro Gln Asp Asp Asn Arg Asp Gly Val Ala Ile Arg Val Ala
515 520 525

Ser Glu Arg Leu Met Arg Arg Asn Gln His Gln Arg Phe Leu Ile Val
530 535 540

Phe Ser Asp Gly Glu Pro Ser Ala Phe Asn Tyr Ser Gln Asp Gly Ile
545 550 555 560

Ile Asp Thr Tyr Glu Ala Val Glu Met Ser Arg Lys Phe Gly Ile Glu
565 570 575

Val Phe Asn Val Phe Leu Ser Gln Asp Pro Ile Thr Glu Asp Val Glu
580 585 590

Gln Thr Ile His Asn Ile Tyr Gly Gln Tyr Ala Ile Phe Val Glu Gly
595 600 605

Val Ala His Leu Pro Gly His Leu Ser Pro Leu Leu Lys Lys Leu Leu
610 615 620

Leu Lys Ser Leu
625

<210> 30

<211> 154

<212> PRT

<213> Staphylococcus sp.

<400> 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 31

<211> 584

<212> PRT

<213> Staphylococcus sp.

<400> 31

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

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

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

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

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

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

Asp Ile Asp Leu Arg Leu Ser Lys Gln Ala Lys Tyr Thr Val Tyr Phe
 100 105 110

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

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

Asp Thr Lys Lys Gln Val Glu Asp Lys Lys Lys Asp Lys Ala Asn Tyr
 145 150 155 160

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

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

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

Val Asp Leu Arg Leu Ser Lys Gln Ala Lys Tyr Thr Val Asn Phe Lys
 210 215 220

Asn Gly Thr Lys Lys Val Ile Asp Leu Lys Ser Gly Ile Tyr Thr Ala
 225 230 235 240

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

Thr Lys Lys His Ile Glu Asn Lys Ala Lys Arg Asn Tyr Gln Val Pro
 260 265 270

Tyr Ser Ile Asn Leu Asn Gly Thr Ser Thr Asn Ile Leu Ser Asn Leu
 275 280 285

Ser Phe Ser Asn Lys Pro Trp Thr Asn Tyr Lys Asn Leu Thr Ser Gln
 290 295 300

Ile Lys Ser Val Leu Lys His Asp Arg Gly Ile Ser Glu Gln Asp Leu
 305 310 315 320

Lys Tyr Ala Lys Lys Ala Tyr Tyr Thr Val Tyr Phe Lys Asn Gly Gly

<400> 32

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Ile Lys Lys Asp Asn Pro Glu Leu Lys Asp Phe Asn Glu Glu Glu
145 150 155 160

Gln Leu Lys Cys Asp Leu Glu Leu Asn Lys Leu Glu Asn Gln Ile Leu
165 170 175

Met Leu Gly Lys Thr Phe Tyr Gln Asn Tyr Arg Asp Asp Val Glu Ser
180 185 190

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

Ala Asn Lys Lys Ala Val Asn Lys Arg Met Leu Glu Asn Lys Lys Glu
210 215 220

Asp Leu Glu Thr Ile Ile Asp Glu Phe Phe Ser Asp Ile Asp Lys Thr
 225 230 235 240
 Arg Pro Asn Asn Ile Pro Val Leu Glu Asp Glu Lys Gln Glu Glu Lys
 245 250 255
 Asn His Lys Asn Met Ala Gln Leu Lys Ser Asp Thr Glu Ala Ala Lys
 260 265 270
 Ser Asp Glu Ser Lys Arg Ser Lys Arg Ser Lys Arg Ser Leu Asn Thr
 275 280 285
 Gln Asn His Lys Pro Ala Ser Gln Glu Val Ser Glu Gln Gln Lys Ala
 290 295 300
 Glu Tyr Asp Lys Arg Ala Glu Glu Arg Lys Ala Arg Phe Leu Asp Asn
 305 310 315 320
 Gln Lys Ile Lys Lys Thr Pro Val Val Ser Leu Glu Tyr Asp Phe Glu
 325 330 335
 His Lys Gln Arg Ile Asp Asn Glu Asn Asp Lys Lys Leu Val Val Ser
 340 345 350
 Ala Pro Thr Lys Lys Pro Thr Ser Pro Thr Thr Tyr Thr Glu Thr Thr
 355 360 365
 Thr Gln Val Pro Met Pro Thr Val Glu Arg Gln Thr Gln Gln Gln Ile
 370 375 380
 Ile Tyr Asn Ala Pro Lys Gln Leu Ala Gly Leu Asn Gly Glu Ser His
 385 390 395 400
 Asp Phe Thr Thr Thr His Gln Ser Pro Thr Thr Ser Asn His Thr His
 405 410 415
 Asn Asn Val Val Glu Phe Glu Glu Thr Ser Ala Leu Pro Gly Arg Lys
 420 425 430
 Ser Gly Ser Leu Val Gly Ile Ser Gln Ile Asp Ser Ser His Leu Thr
 435 440 445
 Glu Arg Glu Lys Arg Val Ile Lys Arg Glu His Val Arg Glu Ala Gln
 450 455 460
 Lys Leu Val Asp Asn Tyr Lys Asp Thr His Ser Tyr Lys Asp Arg Ile
 465 470 475 480
 Asn Ala Gln Gln Lys Val Asn Thr Leu Ser Glu Gly His Gln Lys Arg
 485 490 495
 Phe Asn Lys Gln Ile Asn Lys Val Tyr Asn Gly Lys
 500 505

<210> 33

<211> 520

<212> PRT

<213> Staphylococcus sp.

<400> 33

Met Leu Thr Leu Gln Ile His Thr Gly Gly Ile Asn Leu Lys Lys Lys
 1 5 10 15

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

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

Ala Gln His Asp Glu Ala Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Gln Val Leu Asn
 50 55 60

Met Pro Asn Leu Asn Ala Asp Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu
 65 70 75 80

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

Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe
 100 105 110

Asn Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn
 115 120 125

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

Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu
 145 150 155 160

Ser Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn Asn Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn
 165 170 175

Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg
 180 185 190

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

Leu Leu Ser Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys Ala
 210 215 220

Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu
 225 230 235 240

His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser
 245 250 255

Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys
 260 265 270

Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys
 275 280 285

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

Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser
 305 310 315 320

Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln
 325 330 335

Ala Pro Lys Glu Glu Asp Asn Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp Gly Asn
 340 345 350

Lys Pro Gly Lys Glu Asp Asn Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp Asn Lys
 355 360 365

Lys Pro Gly Lys Glu Asp Asn Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp Asn Asn
 370 375 380

Lys Pro Gly Lys Glu Asp Gly Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp Asn Lys
 385 390 395 400

Lys Pro Gly Lys Glu Asp Asn Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp Gly Asn
 405 410 415

Lys Pro Gly Lys Glu Asp Gly Asn Gly Val His Val Val Lys Pro Gly
 420 425 430

Asp Thr Val Asn Asp Ile Ala Lys Ala Asn Gly Thr Thr Ala Asp Lys
 435 440 445

Ile Ala Ala Asp Asn Lys Leu Ala Asp Lys Asn Met Ile Lys Pro Gly
 450 455 460

Gln Glu Leu Val Val Asp Lys Lys Gln Pro Ala Asn His Ala Asp Ala
465 470 475 480

Asn Lys Ala Gln Ala Leu Pro Glu Thr Gly Glu Glu Asn Pro Phe Ile
485 490 495

Gly Thr Thr Val Phe Gly Gly Leu Ser Leu Ala Leu Gly Ala Ala Leu
500 505 510

Leu Ala Gly Arg Arg Arg Glu Leu
515 520

<210> 34

<211> 291

<212> PRT

<213> Staphylococcus sp.

<400> 34

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

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

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

Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe
50 55 60

Asn Lys Asp Lys Lys Ser Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn
65 70 75 80

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

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

Ser Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn Asn Phe Asn Lys Glu Lys Lys Asn
115 120 125

Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg
130 135 140

Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Ala Ala Pro Ser Gln Ser Ala Asn
145 150 155 160

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

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

His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser
 195 200 205

Leu Lys Ala Ala Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys
 210 215 220

Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys
 225 230 235 240

Glu Lys Lys Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr
 245 250 255

Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Ala Ala Pro Ser
 260 265 270

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

Ala Pro Lys
 290

<210> 35

<211> 34

<212> ADN

<213> Staphylococcus sp.

<400> 35

gctgcacata tggcgcaaca cgatgaagct caac

34

<210> 36

<211> 30

<212> ADN

<213> Staphylococcus sp.

<400> 36

agtgatcct tatgctttgt tagcatctgc

30

<210> 37

<211> 19

<212> PRT

<213> Staphylococcus sp.

<400> 37

Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
1 5 10 15

Arg Gly Ser

<210> 38

<211> 29

<212> ADN

<213> Staphylococcus sp.

<400> 38

aacatatggt caacaaagat caacaaagc 29

<210> 39

<211> 29

<212> ADN

<213> Staphylococcus sp.

<400> 39

aaggatccag attcgtttaa ttttttagc 29

<210> 40

<211> 43

<212> ADN

<213> Staphylococcus sp.

<400> 40

cttcattcaa agtcttaaag cggccccaag ccaagcact aac 43

<210> 41

<211> 43

<212> ADN

<213> Staphylococcus sp.

<400> 41

gtagtgctt tggcttgggg cggctttaag actttgaatg aag 43

<210> 42

<211> 42

<212> ADN

<213> Staphylococcus sp.

<400> 42
catatggttca acaaagataa aaaaagcgcc ttctatgaaa tc 42

<210> 43
<211> 42
<212> ADN
<213> Staphylococcus sp.

<400> 43
gatttcatag aaggcgcttt ttttatcttt gttgaacata tg 42

<210> 44
<211> 42
<212> ADN
<213> Staphylococcus sp.

<400> 44
catatggttca acaaagatgg aggaagcgcc ttctatgaaa tc 42

<210> 45
<211> 42
<212> ADN
<213> Staphylococcus sp.

<400> 45
gatttcatag aaggcgcttc ctccatcttt gttgaacata tg 42

<210> 46
<211> 52
<212> ADN
<213> Staphylococcus sp.

<400> 46
ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctg atgactaagt tgaaaaaaga ag 52

<210> 47
<211> 28
<212> ADN
<213> Staphylococcus sp.

<400> 47
aaggatcccc tccaaaatgt aattgccc 28

<210> 48

<211> 30

<212> ADN

<213> *Staphylococcus* sp.

<400> 48

aaggatccgt ttgtaactct atccaaagac 30

<210> 49

<211> 49

<212> ADN

<213> *Staphylococcus* sp.

<400> 49

ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtg acacctattg cacgattcg 49

<210> 50

<211> 50

<212> ADN

<213> *Staphylococcus* sp.

<400> 50

ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctc agatagcgat tcagattcag 50

<210> 51

<211> 31

<212> ADN

<213> *Staphylococcus* sp.

<400> 51

aaggatccct gtatTTTTctc cttaattttc c 31

<210> 52

<211> 30

<212> ADN

<213> *Staphylococcus* sp.

<400> 52

aaggatccca tggctgcaaa gcaaataatg 30

<210> 53

<211> 51

<212> ADN

<213> *Staphylococcus* sp.

<400> 53

ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtg ccctgggtgta acaaatttat g 51

<210> 54

<211> 37

<212> ADN

<213> *Staphylococcus* sp.

<400> 54

gaaggatccg tttattctag ttaatatata gttaatg 37

<210> 55

<211> 33

<212> ADN

<213> *Staphylococcus* sp.

<400> 55

gaactgcagc tgtatgtctt tggatagagt tac 33

<210> 56

<211> 33

<212> ADN

<213> *Staphylococcus* sp.

<400> 56

gaaggatccg gtggcttttt tacttggatt ttc 33

<210> 57

<211> 33

<212> ADN

<213> *Staphylococcus* sp.

<400> 57

gaactgcagc gacaaactca ttatttgctt tgc 33

<210> 58

<211> 27

<212> ADN

<213> *Staphylococcus* sp.

<400> 58
gaactcgagt ctagcttatt tacatgg 27

<210> 59
<211> 45
<212> ADN
<213> Staphylococcus sp.

<400> 59
gaactcgaga tagaaggcag aatagtaaca aaggattata gtggg 45

<210> 60
<211> 27
<212> ADN
<213> Staphylococcus sp.

<400> 60
gtaggacct gggatagagt tacaac 27

<210> 61
<211> 34
<212> ADN
<213> Staphylococcus sp.

<400> 61
gaactcgagg cattatgtgt atcaciaatt tggg 34

<210> 62
<211> 43
<212> ADN
<213> Staphylococcus sp.

<400> 62
gaactcgaga tagaaggcag agtggtttct ggggagaaga atc 43

<210> 63
<211> 33
<212> ADN
<213> Staphylococcus sp.

<400> 63
gaactcgagg cagccatgca ttaattattt gcc 33

Lisboa, 2016-02-23

REIVINDICAÇÕES

1. Polipéptido imunogénico isolado compreendendo um domínio D variante da proteína A (SpA) que possui (a) pelo menos duas substituições de aminoácido que perturbam a ligação ao fragmento Fc, compreendendo uma substituição de aminoácido em cada uma das posições de aminoácido correspondentes às posições de aminoácido 9 e 10 da SEQ ID NO:2 e (b) pelo menos duas substituições de aminoácido que perturbam a ligação à região V_H3, compreendendo uma substituição de aminoácido em cada uma das posições de aminoácido correspondentes às posições de aminoácido 36 e 37 da SEQ ID NO:2 e (c) uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 70% idêntica à sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2.

2. Polipéptido de acordo com a reivindicação 1, em que a substituição de aminoácido em (a) é a substituição de um resíduo de glutamina por um resíduo de lisina.

3. Polipéptido de acordo com a reivindicação 1, em que a substituição de aminoácido em (a) é a substituição de um resíduo de glutamina por um resíduo de glicina.

4. Polipéptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que a substituição de aminoácido em (b) é a substituição de um resíduo de aspartato por um resíduo de alanina.

5. Polipéptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, possuindo uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80% ou 90% idêntica à sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2.

6. Polipéptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, compreendendo ainda:

(i) uma ou mais variantes de um domínio E, um domínio A, um domínio B ou um domínio C da SpA;

(ii) dois ou mais segmentos do domínio D; ou

(iii) um segmento não proveniente da proteína A, de preferência um segmento de um segundo antígeno; em que o segmento do segundo antígeno é opcionalmente um segmento de antígeno de estafilococos, preferencialmente um segmento de Emp, EsxA, EsxB, EsaC, Eap, Ebh, EsaB, Coa, vWbp, vWh, Hla, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, IsdC, ClfA, ClfB e/ou SasF.

7. Composição imunogénica compreendendo um polipéptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, numa composição farmacêuticamente aceitável.

8. Composição de acordo com a reivindicação 7, compreendendo ainda:

(a) pelo menos um segundo antígeno de estafilococos, preferencialmente em que o segundo antígeno é selecionado entre um péptido EsaB, Emp, EsxA, EsxB, EsaC, Eap, Ebh, Coa, vWbp, vWh, Hla, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, IsdC, ClfA, ClfB, e/ou SasF; ou

(b) um adjuvante, preferencialmente em que a variante da SpA está acoplada a um adjuvante.

9. Composição de acordo com a reivindicação 7 ou 8, compreendendo adicionalmente um polissacarídeo ou oligossacarídeo PIA, um polissacarídeo capsular de tipo V e/ou tipo VIII ou um oligossacarídeo de *S. aureus*.

10. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 9, em que um polissacarídeo capsular de estafilococos é conjugado com uma proteína transportadora, preferencialmente, em que a proteína transportadora é selecionada entre o grupo constituído pela anatoxina tetânica, anatoxina diftérica, CRM 197, proteína D de *Haemophilus influenzae*, pneumolisina e anatoxina alfa.

11. Vacina compreendendo o polipéptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, ou a composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 10, e um excipiente farmacêuticamente aceitável.

12. Molécula de ácido nucleico recombinante, compreendendo uma sequência que codifica o polipéptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6.

13. Método de produção de uma vacina, compreendendo os passos de misturar os antigénios para preparar a composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 10 e adicionar um excipiente farmacêuticamente aceitável.

14. Composição para utilizar na provocação de uma resposta imune contra uma bactéria do tipo estafilococos num sujeito, compreendendo um polipéptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6 ou uma composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 10.

15. Composição para utilizar na provocação de uma resposta imune contra uma bactéria do tipo estafilococos num sujeito de acordo com a reivindicação 14:

(a) em que também é administrado um adjuvante ao sujeito;

(b) em que a bactéria do tipo estafilococos é uma bactéria *S. aureus*;

(c) em que a bactéria do tipo estafilococos é resistente a um ou mais tratamentos, de preferência em que a bactéria do tipo estafilococos é resistente à meticilina;

(d) em que a composição é administrada mais de uma vez ao sujeito;

(e) em que a composição é administrada por via oral, parentérica, subcutânea, intramuscular ou intravenosa;

(f) em que a composição compreende uma bactéria recombinante que não é do tipo estafilococos expressando a variante da SpA, preferencialmente em que a bactéria recombinante que não é do tipo estafilococos é uma *Salmonella*;

(g) em que o sujeito é um mamífero, de preferência um ser humano;

(h) em que a resposta imune é uma resposta imune protetora; ou

(i) em que o sujeito é suspeito de ter ou está em risco de desenvolver uma infeção por estafilococos, de preferência em que o sujeito é diagnosticado com uma infeção por estafilococos persistente.

Lisboa, 2016-02-23

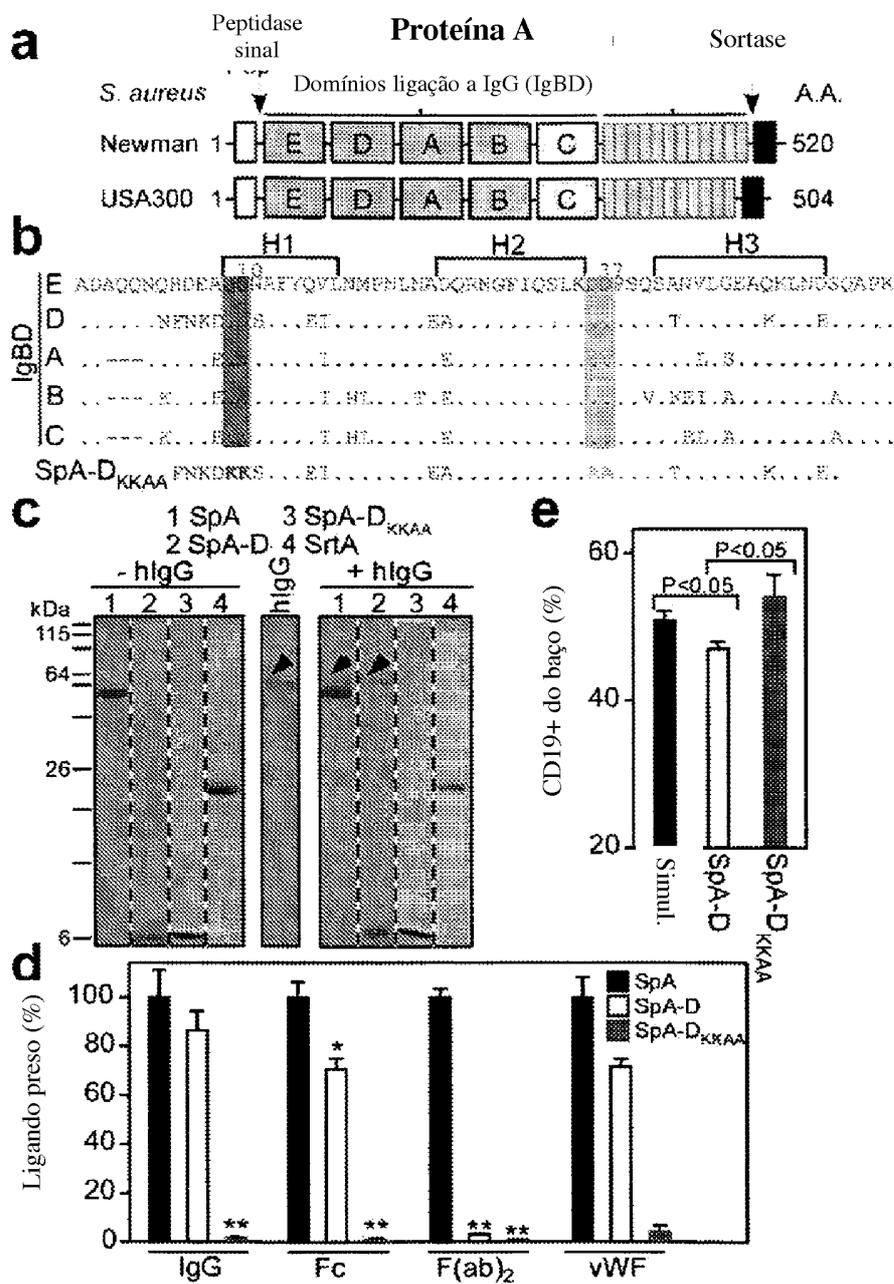


FIG. 1

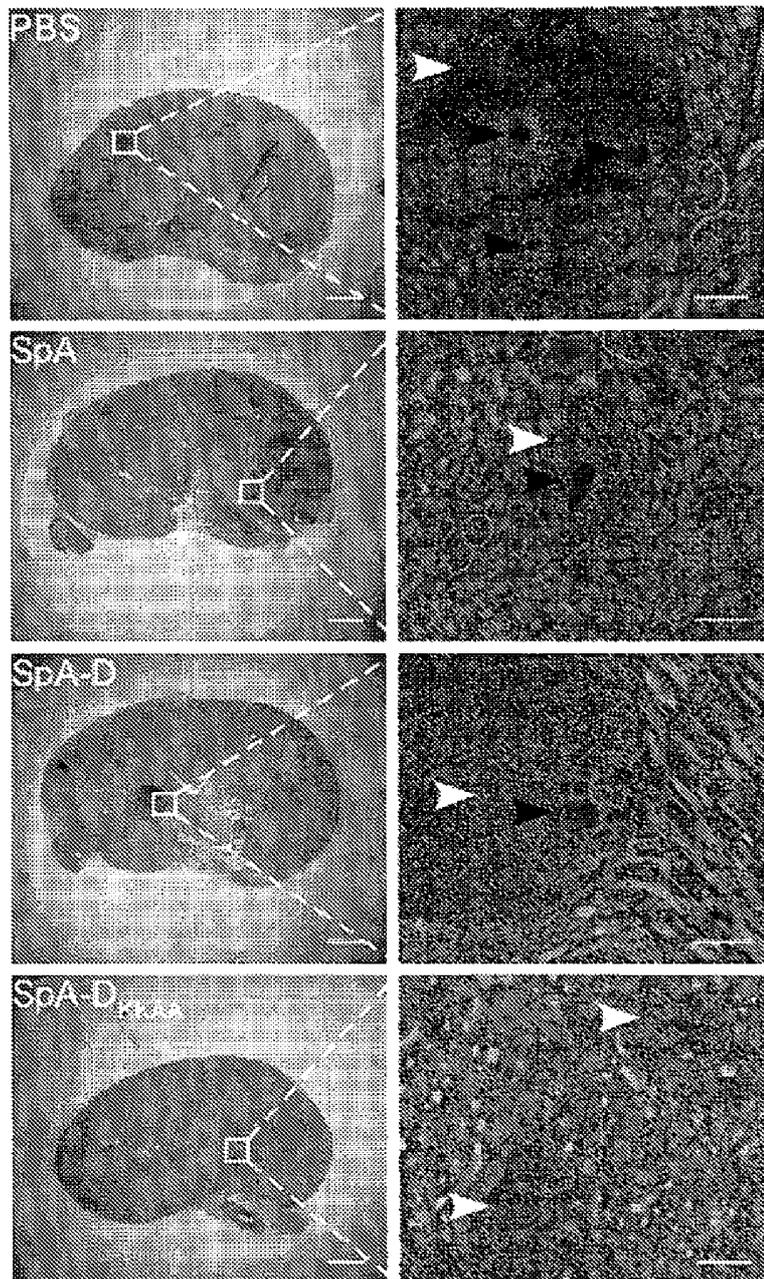


FIG. 2

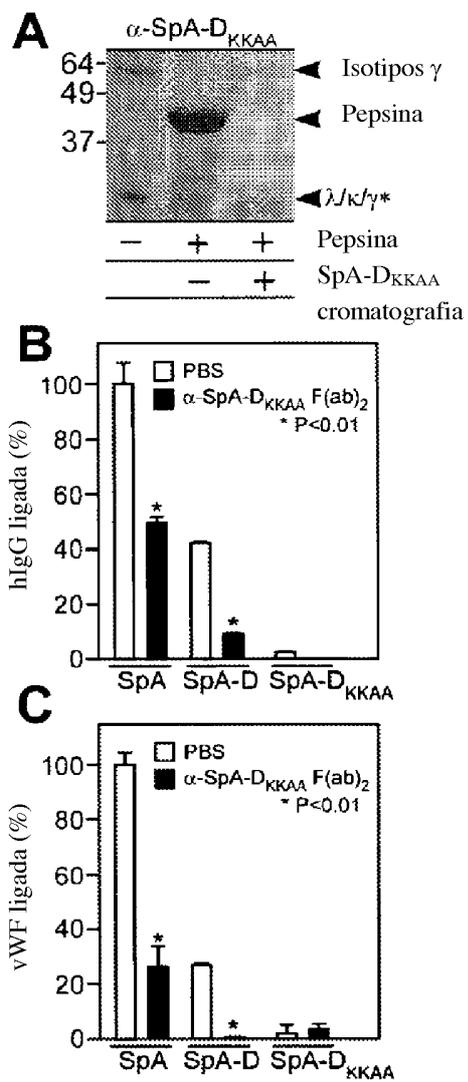


FIG. 3

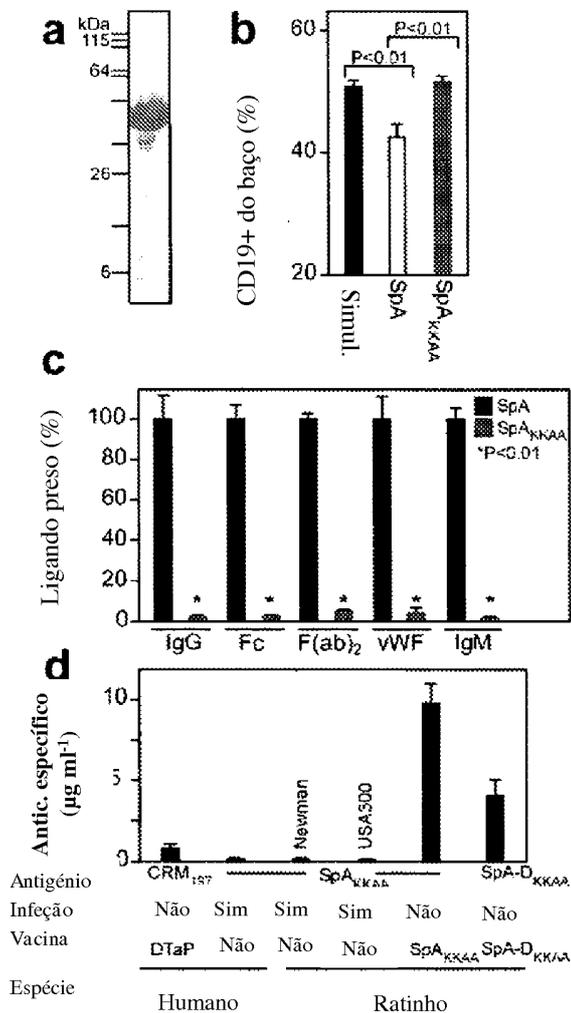


FIG. 4

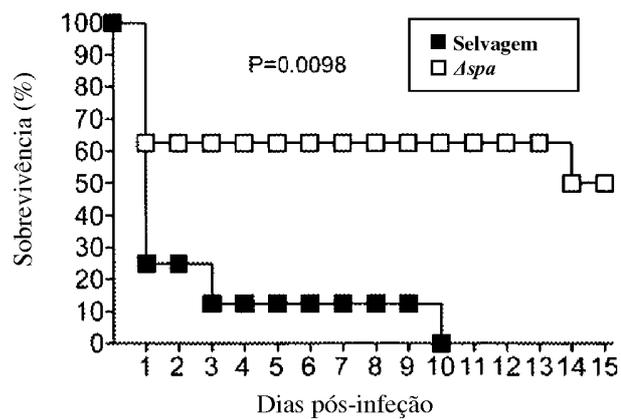


FIG. 5

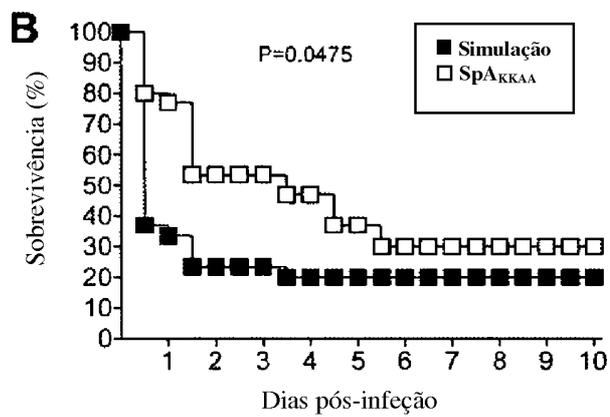
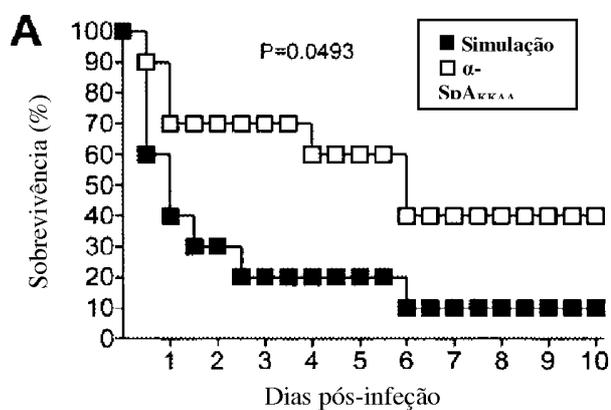


FIG. 6

$\log_{10}(\text{UFC}) \text{ g}^{-1} \text{ tecido}$

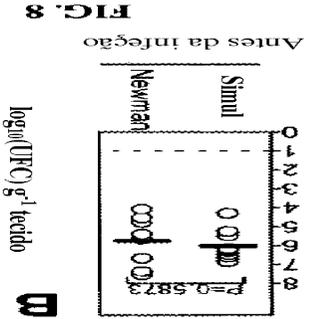


FIG. 8

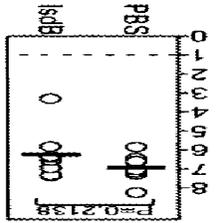
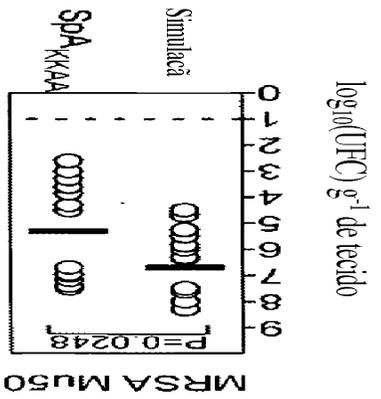


FIG. 7



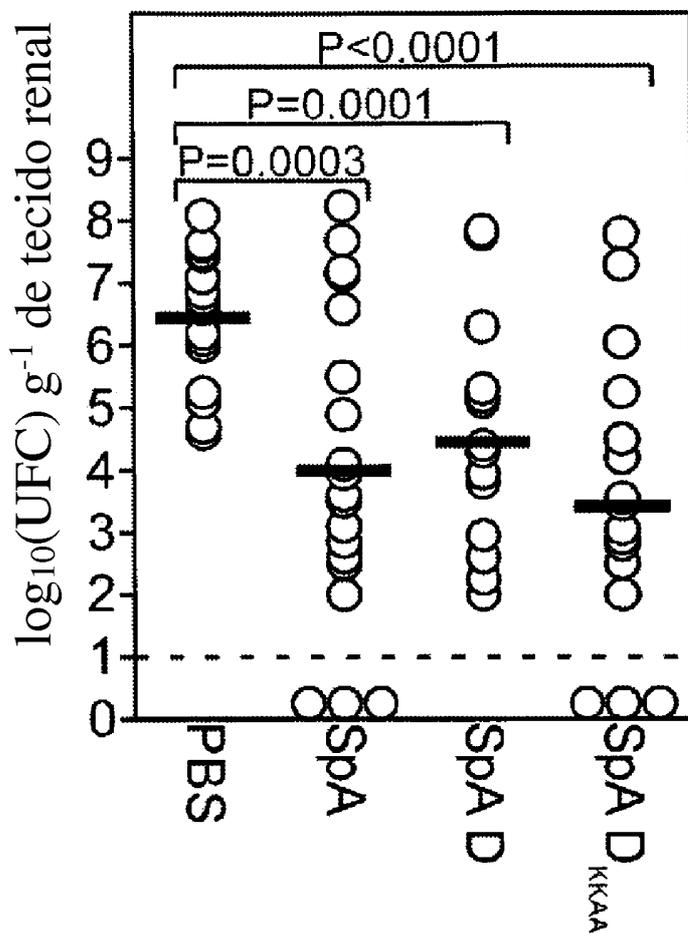


FIG. 9

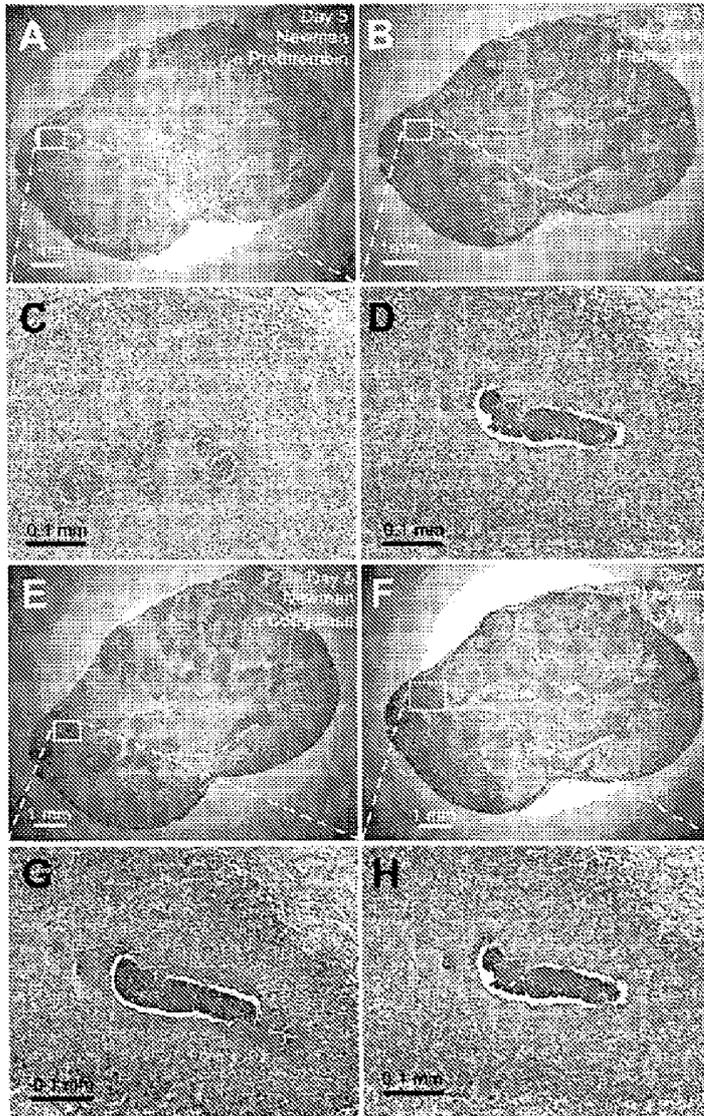


FIG. 10

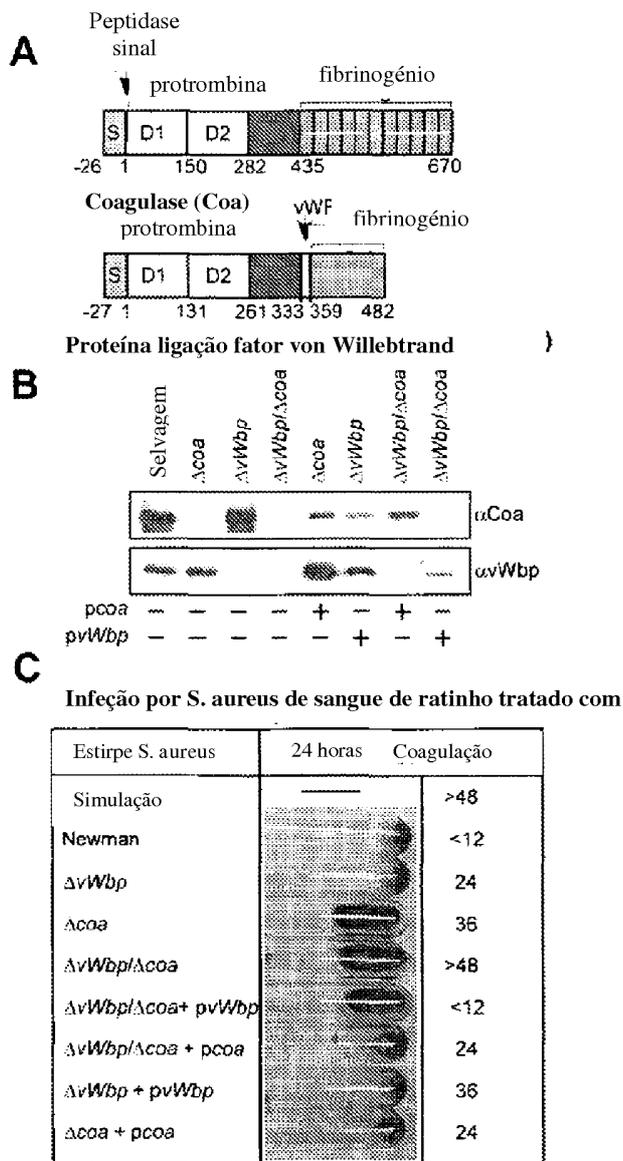
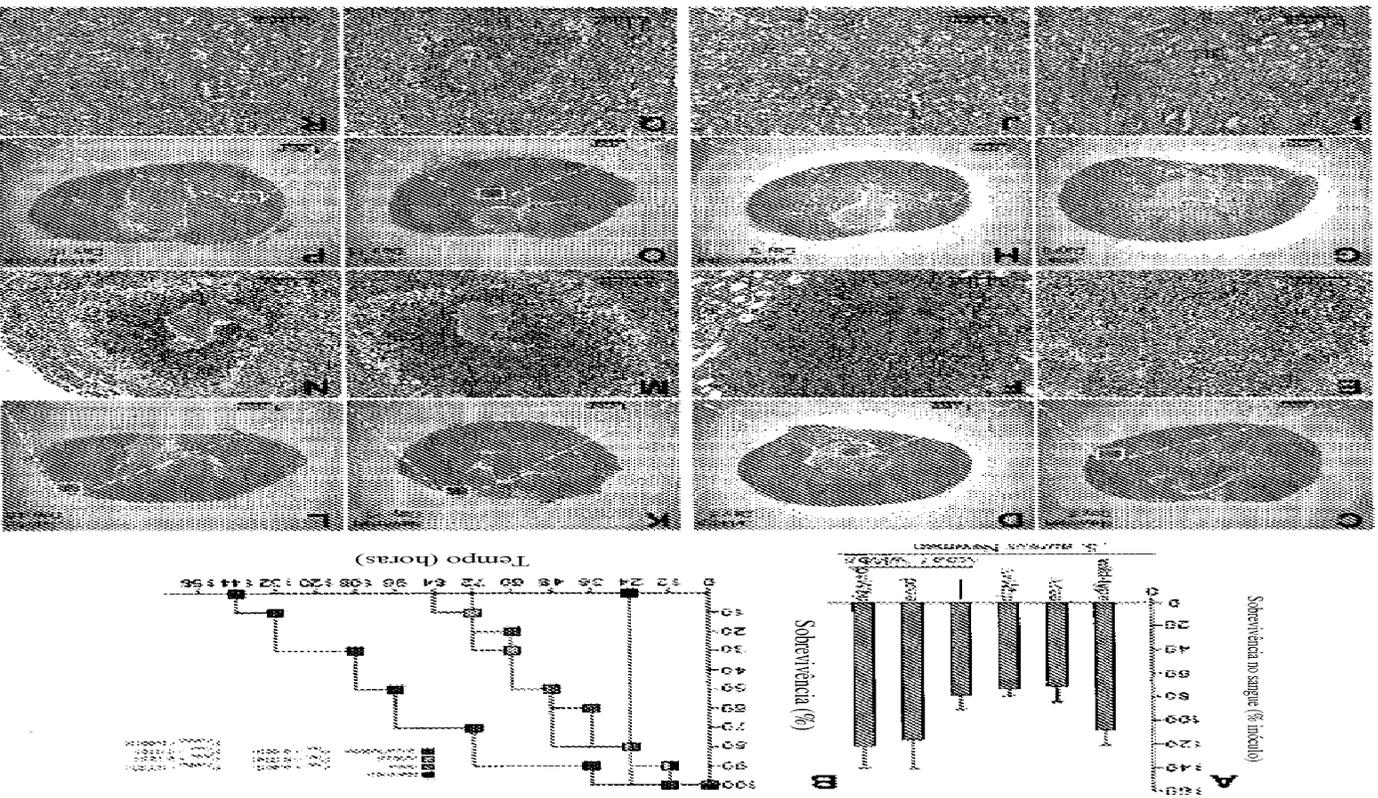


FIG. 11



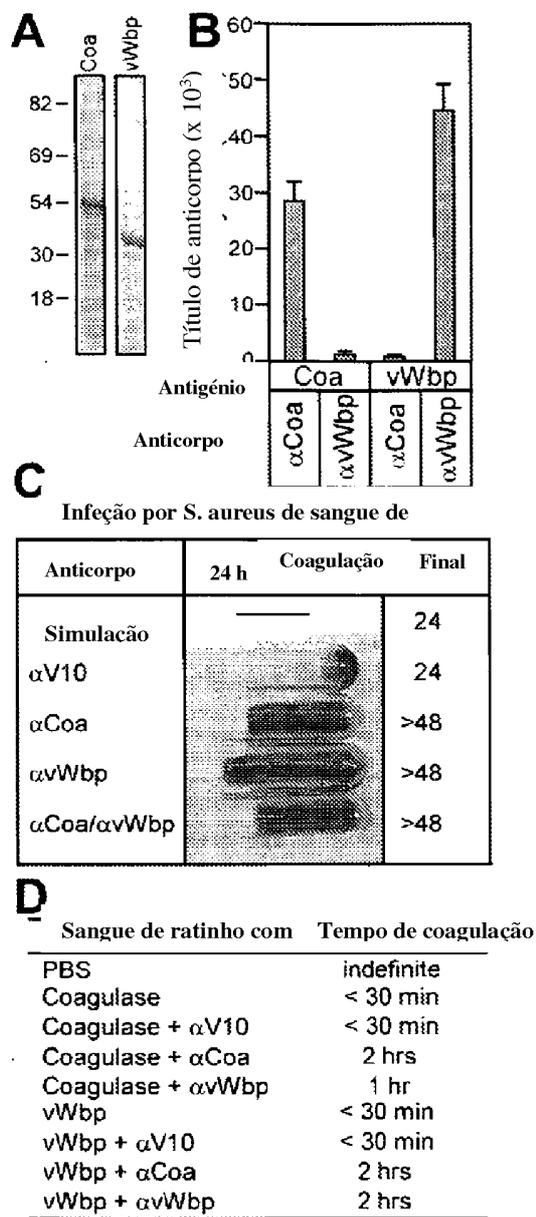


FIG. 13

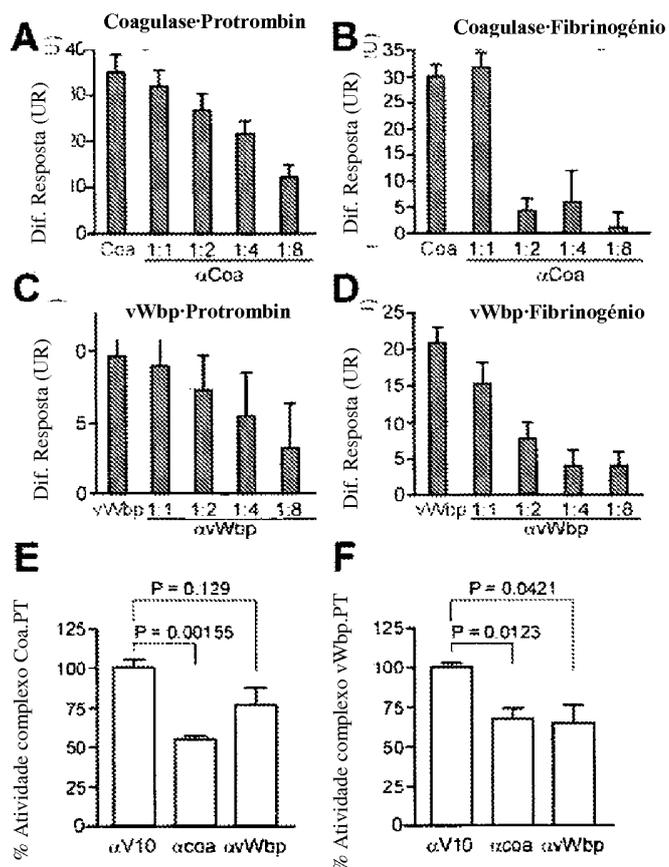


FIG. 14

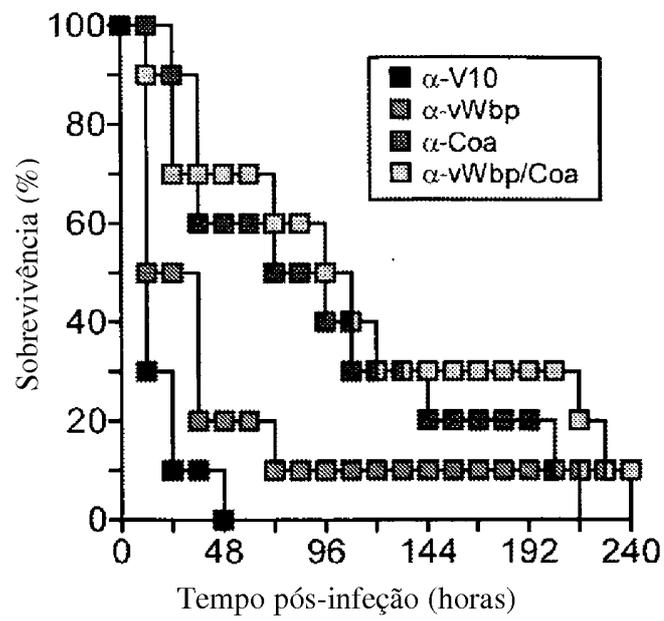


FIG. 15

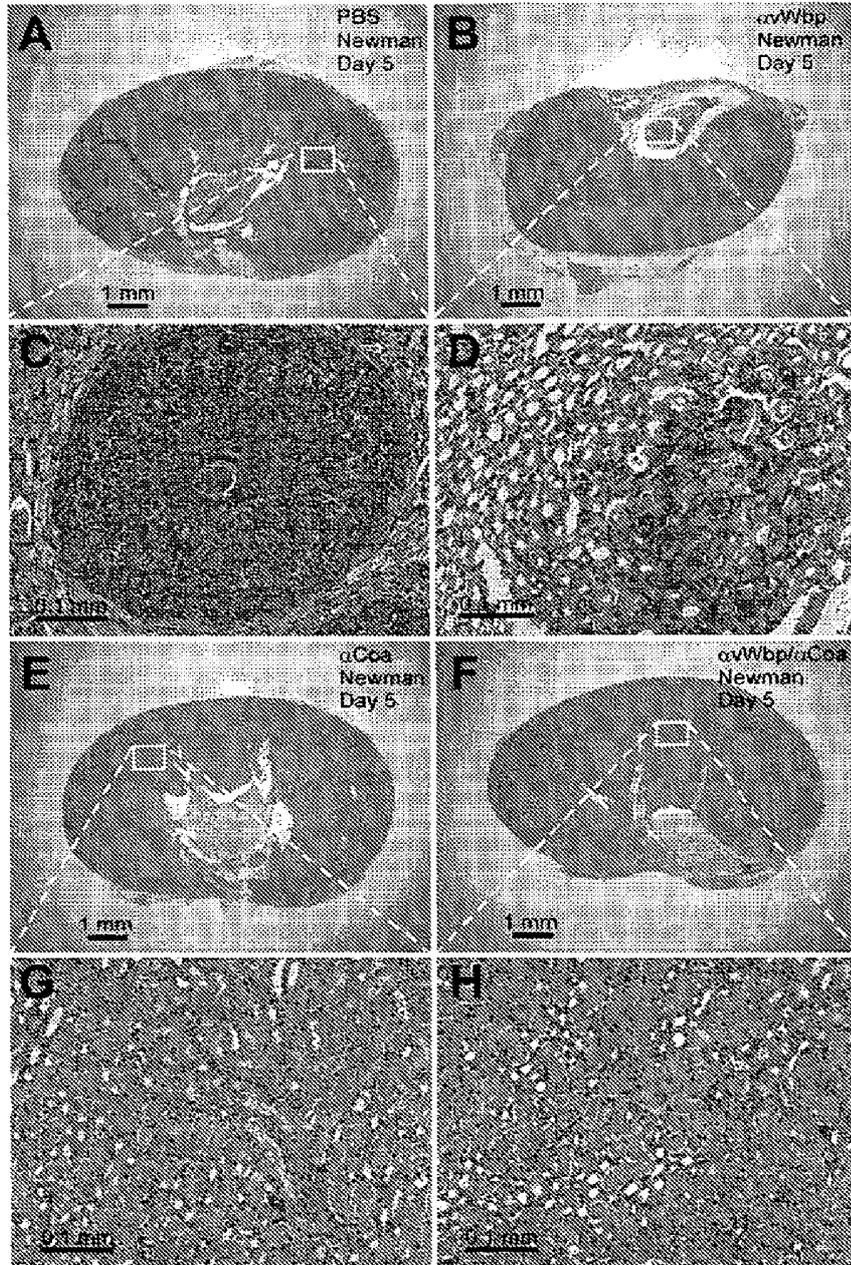


FIG. 16

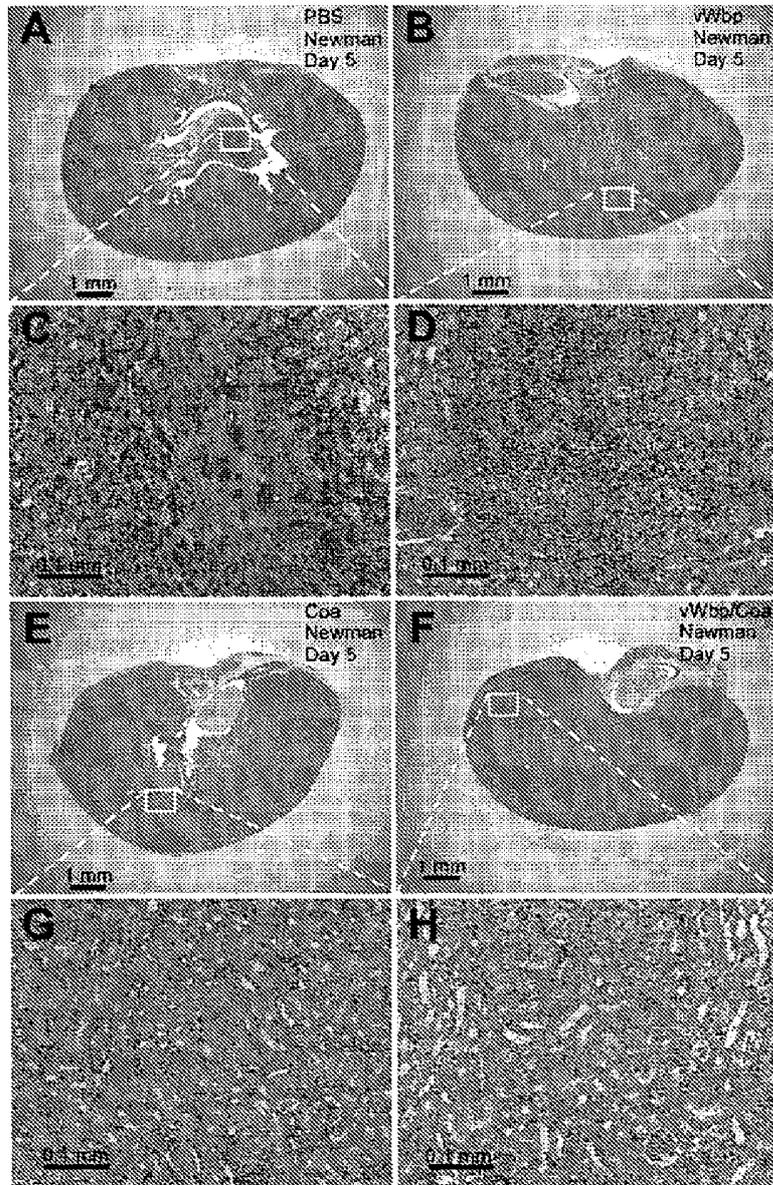


FIG. 17