



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년08월31일
 (11) 등록번호 10-1773368
 (24) 등록일자 2017년08월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/31 (2006.01) *A61K 39/085* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2011-7026053
 (22) 출원일자(국제) 2010년04월05일
 심사청구일자 2015년02월25일
 (85) 번역문제출일자 2011년11월01일
 (65) 공개번호 10-2011-0138397
 (43) 공개일자 2011년12월27일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2010/029959
 (87) 국제공개번호 WO 2011/005341
 국제공개일자 2011년01월13일
 (30) 우선권주장
 61/166,432 2009년04월03일 미국(US)
 (뒷면에 계속)
 (56) 선행기술조사문헌
 Martin Mempel 등. J Invest Dermatol. Vol.
 111, No. 3, 페이지 452-456 (1998.)*
 (뒷면에 계속)

(73) 특허권자
유니버시티 오브 시카고
 미국 일리노이 60637 시카고 5801 사우스 엘리스
 애비뉴
 (72) 발명자
슈니워드 올라프
 미국 일리노이주 60637 시카고 스위트 300 사우스
 우드론 5555 오피스 오브 테크놀로지 앤드 인텔렉
 추얼 프라퍼티
칭 엘리스
 미국 일리노이주 60637 시카고 스위트 300 사우스
 우드론 5555 오피스 오브 테크놀로지 앤드 인텔렉
 추얼 프라퍼티
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
장훈

전체 청구항 수 : 총 16 항

심사관 : 안규정

(54) 발명의 명칭 **단백질 A(SpA) 변이체와 관련된 조성물 및 방법**

(57) 요약

본 발명은 비-독소발생성 단백질 A (SpA) 변이체를 사용하여 스타필로코커스 세균 감염을 치료 또는 예방하기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다.

(72) 발명자

미사카 도미니크

미국 일리노이주 60637 시카고 스위트 300 사우스
우드론 5555 오피스 오브 테크놀로지 앤드 인텔렉
추얼 프라퍼티

김환

미국 일리노이주 60637 시카고 스위트 300 사우스
우드론 5555 오피스 오브 테크놀로지 앤드 인텔렉
추얼 프라퍼티

(56) 선행기술조사문헌

Maghnus ?Seaghdha 등. FEBS. Vol. 273, No. 21,
페이지 4831-4841 (2006.)

US06197927 B1

W02002059148 A2*

W02002059148 A2*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(30) 우선권주장

61/237,956 2009년08월28일 미국(US)

61/287,996 2009년12월18일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 단백질 A (SpA) D 도메인 변이체를 포함하는 분리된 폴리펩타이드로서, 상기 SpA D 도메인 변이체가 서열번호 2의 아미노산 서열과 적어도 70% 동일한 아미노산 서열로 이루어지고, (a) 서열번호 2의 위치 9 및 10에 상응하는 위치에 있는 아미노산들의 리신으로의 치환을 포함하는, Fc 결합을 파괴하는 적어도 2개의 아미노산 치환 및 (b) 서열번호 2의 위치 36 및 37에 상응하는 위치에 있는 아미노산들의 알라닌으로의 치환을 포함하는, VH3 결합을 파괴하는 적어도 2개의 아미노산 치환을 가지는, 분리된 폴리펩타이드.

청구항 2

제1항에 있어서, SpA E 도메인, A 도메인, B 도메인 및 C 도메인 분절의 하나 이상의 변이체를 추가로 포함하는, 분리된 폴리펩타이드.

청구항 3

제1항에 있어서, 두 개 이상의 D 도메인 분절을 포함하는, 분리된 폴리펩타이드.

청구항 4

제1항에 있어서, 제2 항원 분절을 추가로 포함하는, 분리된 폴리펩타이드.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 제2 항원 분절이 스타필로코커스 항원 분절인, 분리된 폴리펩타이드.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 스타필로코커스 항원 분절이 Emp, EsxA, EsxB, EsaC, Eap, Ebh, EsaB, Coa, vWbp, vWh, H1a, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, IsdC, ClfA, ClfB 및 SasF 분절 중의 하나 이상을 포함하는, 분리된 폴리펩타이드.

청구항 7

제1항의 분리된 폴리펩타이드를 포함하는, 면역 반응의 자극을 필요로 하는 피검체에서 면역 반응을 자극할 수 있는 펩타이드 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 적어도 제2 스타필로코커스 항원을 추가로 포함하는, 펩타이드 조성물.

청구항 9

제1항의 분리된 폴리펩타이드를 포함하고, 상기 폴리펩타이드는 비-독성인, 면역 반응의 자극을 필요로 하는 피검체에서 면역 반응을 자극할 수 있는 면역원성 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, Emp, EsxA, EsxB, EsaC, Eap, Ebh, EsaB, Coa, vWbp, vWh, H1a, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, IsdC, ClfA, ClfB 및 SasF로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 다른 스타필로코커스 항원 또는 이의 면역원성 단편을 추가로 포함하는, 면역원성 조성물.

청구항 11

제1항의 분리된 폴리펩타이드 및 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는, 스타필로코커스 감염의 치료 또는 예방용 백신.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 스태필로코커스 감염의 치료 또는 예방용 약제의 제조를 위한, 백신.

청구항 13

유효량의 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 단백질 A (SpA) E, D, A, B, C 도메인 변이체를 포함하는 조성물로서,

상기 변이체가, D 도메인 중의 서열번호 2의 위치 9 및 10에 있는 아미노산들의 치환; E 도메인, A 도메인, B 도메인 및 C 도메인 중의 하나 이상에서 서열번호 2의 위치 9 및 10에 상응하는 아미노산들의 치환; D 도메인 중의 서열번호 2의 위치 36 및 37에 있는 아미노산들의 치환; 및 E 도메인, A 도메인, B 도메인 및 C 도메인 중의 하나 이상에서 서열번호 2의 위치 36 및 37에 상응하는 아미노산들의 치환을 포함하고,

이때 상기 위치 9 및 10 또는 9 및 10에 상응하는 위치에서의 아미노산들의 치환은 리신 잔기로의 치환이고, 상기 위치 36 및 37 또는 36 및 37에 상응하는 위치에서의 아미노산들의 치환은 알라닌 잔기로의 치환인, 피검체에서 스태필로코커스 세균에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 제2 스태필로코커스 항원을 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 제2 스태필로코커스 항원이 Emp, EsxA, EsxB, EsaC, Eap, Ebh, EsaB, Coa, vWbp, vWh, Hla, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, IsdC, ClfA, ClfB 및 SasF 중의 하나 이상인, 조성물.

청구항 16

숙주 세포로부터 제1항의 폴리펩타이드를 획득하는 단계를 포함하는, 제1항의 폴리펩타이드를 제조하는 방법.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 미국 국립보건원에 의해 수여된 AI057153, AI75258, AI052474 및 GM007281하의 정부 보조로 이루어졌다. 당해 정부는 본 발명에서 특정 권리를 갖는다.

[0002] 본원은 2009년 4월 3일에 출원된 미국 임시특허출원 제61/166,432호, 2009년 8월 28일에 출원된 미국 임시특허출원 제61/237,956호 및 2009년 12월 18일에 출원된 미국 임시특허출원 제61/287,996호에 대해 우선권을 주장하

며, 이들 출원의 내용 전체는 본원 명세서에 참고로 인용된다.

[0003] 본 발명은 일반적으로, 면역학, 미생물학 및 병리학의 분야에 관한 것이다. 보다 특정적으로, 본 발명은 세균에 대하여 면역 반응을 유도하는데 사용될 수 있는 세균성 단백질 A 변이체와 연관된 방법 및 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0004] 공동체 및 병원에서 후천적으로 획득되는 모든 감염 수는 혈관내 기구의 사용 증가와 함께 최근 몇 년에 걸쳐 증가해 왔다. 병원의 후천적 (병원획득성) 감염은 질병률 및 사망률의 주요 원인이 되고 있으며, 더욱 특히 미국에서 그러한데, 이 경우 그러한 감염이 매년 2백만명 이상의 환자에게 영향을 미치고 있다. 가장 빈도가 높은 감염은 요도 감염 (감염의 33%), 뒤이어 폐렴 (15.5%), 수술 부위 감염 (14.8%) 및 일차 혈류 감염 (13%)이다 (Emorl and Gaynes, 1993).

[0005] 주요 병원획득성 병원체는 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 코아글라제-음성 스태필로코커스 (대체로 스태필로코커스 에피더미디스(*Staphylococcus epidermidis*)), 엔테로코커스 종(*enterococcus spp.*), 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 및 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)를 포함한다. 비록 이들 병원체가 거의 동일한 수치의 감염을 유발한다고 하지만, 항생제 내성 분리체의 빈도와 합친 그들 병원체가 유발할 수 있는 질병의 중증도는 가장 심각한 병원획득성 병원체로서 에스. 아우레우스 및 에스. 에피더미디스가 순위에 올라 있음과 맞아 떨어진다.

[0006] 스태필로코커스는 독소 생성 또는 침투를 통해 사람 및 기타 동물에서 다양한 질병을 유발할 수 있다. 또한, 스태필로코커스 독소는 이 세균이 불량하게 저장된 식품에서 자랄 수 있기 때문에 식중독의 흔한 원인이다.

[0007] 스태필로코커스 에피더미디스는 손상된 의료기의 감염 및 수술 부위의 감염의 원인을 제공하는 중요한 기회 병원체이기도 한 보통의 피부 공생균이다. 에스. 에피더미디스에 의해 감염된 의료기는 심박조정기, 뇌척수액 셉트, 지속성 외래 복막 투석 카테터, 정형 의료기 및 인공심장판막을 포함한다.

[0008] 스태필로코커스 아우레우스는 중대한 질병률 및 사망률을 보이는 병원획득성 감염의 가장 흔한 원인이다. 이 균은 골수염, 심내막염, 패혈성 관절염, 폐렴, 농양 및 독성 쇼크 증후군의 일부 환자의 원인이다. 에스. 아우레우스는 무수 표면상에서 생존할 수 있으며, 이에 따라 전파 기회를 증가시킨다. 어떠한 에스. 아우레우스 감염도 혈류내로 흡수된 외독소에 대한 피부 반응인 스태필로코커스 화상피부증후군을 일으킬 수 있다. 또한, 이 균은 생명에 위협을 줄 수 있는 패혈증의 한 유형인 농혈증을 유발할 수 있다. 문제가 되는 것은, 메티실린-내성 스태필로코커스 아우레우스 (MRSA)가 병원획득성 감염의 주요 원인이 된 것이다.

[0009] 에스. 아우레우스 및 에스. 에피더미디스 감염은 전형적으로 페니실린을 항생제로 선택하여 치료하는데, 메티실린-내성 분리체의 경우는 반코마이신을 사용한다. 항생제에 대해 넓은 스펙트럼의 내성을 보이는 스태필로코커스 균주의 비율은 점점 증가하여 보편화된 추세로 효과적인 항균 요법에 위협이 되고 있다. 또한, 반코마이신 내성 에스. 아우레우스의 최근 출현은 더 이상 효과적인 치료법이 없는 MRSA 균주가 출현하여 퍼지고 있다는 공포를 일으켜 왔다.

[0010] 스태필로코커스 감염에 대한 항생제 치료의 대안으로서 스태필로코커스 항원에 대한 항체를 이용하는 연구가 진행중이다. 이 요법은 폴리클로날 항혈청의 투여 (W000/15238, W000/12132) 또는 리포타이콘산에 대한 모노클로날 항체로의 치료 (W098/57994)를 포함한다.

[0011] 치료 대안의 방법은 스태필로코커스에 대한 면역 반응을 발생하기 위한 능동 백신접종을 이용하는 것이다. 에스. 아우레우스 계통은 서열이 분석되어 있으며 암호화 서열 중 잠재적 항원의 확인을 유도할 수 있는 많은 서열들이 확인되어 있다 (W002/094868, EP0786519). 에스. 에피더미디스의 경우도 마찬가지이다 (W001/34809). 이 방법이 개량된 것으로서, 스태필로코커스 감염을 앓고 있는 환자로부터의 고도면역 혈청에 의해 인식되는 단백질들이 확인되어 있다 (W001/98499, W002/059148).

[0012] 에스. 아우레우스는 과다한 독성 인자를 세포외 환경내로 분비한다 (Archer, 1998; Dinges et al., 2000; Foster, 2005; Shaw et al., 2004; Sibbald et al., 2006). 대부분 분비된 단백질처럼, 이들 독성 인자들은 원형질막을 통과하여 Sec 시스템에 의해 전좌한다. Sec 시스템에 의해 분비된 단백질들은 N-말단 리더 펩타이드를 가지며, 이 펩타이드는 일단 예비단백질이 Sec 트랜스로콘에 참여하면 리더 펩타이드에 의해 제거된다 (Dalbey and Wickner, 1985; van Wely et al., 2001). 최근 계통 분석은 악티노박테리아 및 퍼미쿠테스의 균주들이 Sec-독립적 방식으로 단백질들의 부분집합을 인식하는 추가의 분비 시스템을 암호화하고 있음을 제시한

다 (Pallen, 2002). 마이코박테리움 투버쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*)의 ESAT-6 (초기 분비된 항원 표적 6 kDa) 및 CFP-10 (배양 여액 항원 10 kDa)이 엠. 투버쿨로시스에서 ESX-1 또는 Snm이라고 하는 그러한 새로운 분비 시스템의 첫 번째 기질로 대표된다 (Andersen et al., 1995; Hsu et al., 2003; Pym et al., 2003; Stanley et al., 2003). 에스. 아우레우스의 경우, 두 가지 ESAT-6 유사 인자 (EsxA 및 EsxB)가 Ess 경로 (ESAT-6 분비 시스템)에 의해 분비된다 (Burts et al., 2005).

[0013] 에스. 아우레우스를 표적으로 하거나 이 균이 생성하는 외래단백질을 표적으로 하는 백신의 첫 번째 생성은 한정된 성공을 충족하여 주었다 (Lee, 1996). 스타필로코커스 감염에 대해 효과적인 백신을 개발할 필요성이 남아 있다. 또한, 스타필로코커스 감염을 치료하기 위한 추가의 조성물이 필요하다.

발명의 내용

[0014] 스타필로코커스 아우레우스의 세포벽 고정된 표면 단백질인 단백질 A (SpA) (서열번호 33)은 선천 및 후천 면역 반응으로부터 세균 침투를 가능하게 한다. 단백질 A는 Fc 부분에서 면역글로불린과 결합하고, B 세포 증식과 아포토시스를 부적절하게 자극하는 B 세포 수용체의 VH3 도메인과 상호작용하며, 폰빌레브란트 A1 도메인과 결합하여 세포내 응고를 활성화하고, 또한 TNF 수용체-1과 결합하여 스타필로코커스 폐렴의 발병에 역할을 한다. 단백질 A가 면역글로불린을 포획하고 독성의 속성을 나타낸다는 사실 때문에, 이 표면분자가 사람의 백신으로 작용할 수 있다는 가능성이 완전히 배제되어 왔었다. 본 발명자들은 단백질 A 변이체가 더 이상 면역글로불린과 결합할 수 없으며, 그럼으로써 독성원 잠복성으로부터 탈피되어, 즉 비-독소발생성이어서 스타필로코커스 질병에 대해 예방적 체액성 면역 반응을 자극함을 입증한다.

[0015] 특정 양태에서, SpA 변이체는 변이체 A, B, C, D 및 E 도메인을 포함한 전체 길이 SpA 변이체이다. 특정 관점에서, SpA 변이체는 서열번호 34의 아미노산 서열과 80, 90, 95, 98, 99 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 그러한 서열로 이루어진다. 다른 양태에서, SpA 변이체는 SpA의 분절을 포함한다. SpA 분절은 적어도 또는 많아야 1, 2, 3, 4, 5개 또는 그 이상의 IgG 결합 도메인을 포함할 수 있다. IgG 도메인은 적어도 또는 많아야 1, 2, 3, 4, 5개 또는 그 이상의 변이체 A, B, C, D 또는 E 도메인일 수 있다. 특정 관점에서, SpA 변이체는 적어도 또는 많아야 1, 2, 3, 4, 5개 또는 그 이상의 변이체 A 도메인을 포함한다. 추가의 관점에서, SpA 변이체는 적어도 또는 많아야 1, 2, 3, 4, 5개 또는 그 이상의 변이체 B 도메인을 포함한다. 다른 추가의 관점에서, SpA 변이체는 적어도 또는 많아야 1, 2, 3, 4, 5개 또는 그 이상의 변이체 C 도메인을 포함한다. 또 다른 추가의 관점에서, SpA 변이체는 적어도 또는 많아야 1, 2, 3, 4, 5개 또는 그 이상의 변이체 D 도메인을 포함한다. 특정 관점에서, SpA 변이체는 적어도 또는 많아야 1, 2, 3, 4, 5개 또는 그 이상의 변이체 E 도메인을 포함한다. 추가의 관점에서, SpA 변이체는 여러 가지 조합 및 순열로 A, B, C, D 및 E 도메인의 배합물을 포함한다. 배합물은 SpA 신호 펩타이드 분절, SpA 영역 X 분절 및/또는 SpA 분류 신호 분절의 전부 또는 일부를 포함한다. 다른 관점으로, SpA 변이체는 SpA 신호 펩타이드 분절, SpA 영역 X 분절 및/또는 SpA 분류 신호 분절을 포함하지 않는다. 특정 관점에서, 변이체 A 도메인은 서열번호 4의 위치 7, 8, 34 및/또는 35에서의 치환을 포함한다. 다른 관점에서, 변이체 B 도메인은 서열번호 6의 위치 7, 8, 34 및/또는 35에서의 치환을 포함한다. 또 다른 관점에서, 변이체 C 도메인은 서열번호 5의 위치 7, 8, 34 및/또는 35에서의 치환을 포함한다. 특정 관점에서, 변이체 D 도메인은 서열번호 2의 위치 9, 10, 37 및/또는 38에서의 치환을 포함한다. 추가의 관점에서, 다른 관점에서, 변이체 E 도메인은 서열번호 3의 위치 6, 7, 33 및/또는 34에서의 치환을 포함한다.

[0016] 특정 관점에서, SpA 변이체는 (a) SpA 도메인 A, B, C, D 및/또는 E의 IgG Fc 결합 서브도메인에서 하나 이상의 아미노산 치환, 및 (b) V_H3과의 결합을 파괴하거나 감소시키는 SpA 도메인 A, B, C, D 및/또는 E의 V_H3 결합 서브도메인에서의 하나 이상의 아미노산 치환 중의 치환을 포함한다. 다른 추가의 관점에서, SpA 변이체의 아미노산 서열은 서열번호 2 내지 6의 아미노산 서열과 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 100% 동일한 (이들 사이의 모든 수치 및 범위를 포함함) 아미노산 서열을 포함한다.

[0017] 추가의 관점에서, SpA 변이체는 (a) SpA 도메인 D의 IgG Fc 결합 서브도메인 또는 IgG Fc와의 결합을 차단하거나 감소시키는 다른 IgG 도메인에서의 상응하는 아미노산 위치에서의 하나 이상의 아미노산 치환 및 (b) SpA 도메인 D의 V_H3 결합 서브도메인 또는 V_H3와의 결합을 차단하거나 감소시키는 다른 IgG 도메인에서의 상응하는 아미노산 위치에서의 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 특정 관점에서, 도메인 D의 IgG Fc 결합 서브도메인의 아미노산 잔기 F5, Q9, Q10, S11, F13, Y14, L17, N28, I31 및/또는 K35 (서열번호 2, QQNNFNKDDQSAFYELNMPNLNEAQRNGFIQSLKDDPSQSTNVLGEAKKLNES)는 변형되거나 치환된다. 특정 관점에서, 도메인 D

의 V_H3 결합 서브도메인의 아미노산 잔기 Q26, G29, F30, S33, D36, D37, Q40, N43 및/또는 E47 (서열번호 2)는 변형되거나 치환되어 결과적으로 Fc 또는 V_H3와의 결합이 약화된다. 추가의 관점에서, 도메인 A, B, C 및/또는 E의 상응하는 위치에서 상응하는 변형 또는 치환이 제작될 수 있다. 상응하는 위치는 도메인 D 아미노산 서열과 SpA의 다른 IgG 결합 도메인의 아미노산 서열 중 하나 이상의 정렬로서 정의된다 (예: 도 1 참조). 특정 관점에서, 아미노산 치환은 다른 20개 아미노산 중 어느 것일 수도 있다. 추가의 관점에서, 보존 아미노산 치환이 가능한 아미노산 치환으로부터 특정적으로 배제될 수 있다. 다른 관점에서 단지 비-보존 치환만 포함된다. 어느 경우든, SpA 독성이 유의적으로 감소되도록 도메인의 결합을 감소시키는 치환 중 어떠한 치환도 고려되며 또한 그러한 치환의 어떠한 조합도 고려된다. 결합에 있어서 감소의 유의성은 피검체에게 투여되었을 때 최소 내지 무 독성을 생성하는 변이를 가리키며 본원에 기술된 시험관내 방법을 사용하여 평가할 수 있다.

[0018] 특정 양태에서, 변이 SpA는 적어도 또는 많아야 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상의 변이 SpA 도메인 D 펩타이드를 포함한다. 특정 관점에서, 변이 SpA의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19개 또는 그 이상의 아미노산 잔기가 치환되거나 변형되며, 이들로 한정되는 것은 아니지만 도메인 D의 IgG Fc 결합 서브도메인의 아미노산 F5, Q9, Q10, S11, F13, Y14, L17, N28, I31 및/또는 K35 (서열번호 2) 및 도메인 D의 V_H3 결합 서브도메인의 아미노산 잔기 Q26, G29, F30, S33, D36, D37, Q40, N43 및/또는 E47 (서열번호 2)를 포함한다. 본 발명의 한 가지 관점에서, 서열번호 2의 위치 9 및/또는 10(또는 다른 도메인에서의 상응하는 위치)에서 글루타민 잔기가 돌연변이된다. 본 발명의 한 가지 관점에서, 서열번호 2의 아스파르트산 잔기 36 및/또는 37 (또는 다른 도메인에서의 상응하는 위치)이 돌연변이된다. 추가의 관점에서, 글루타민 9 및/또는 10, 및 아스파르트산 잔기 36 및 37이 돌연변이된다. 본원에 기술된 정제된 비-독소발생성 SpA 또는 SpA-D 돌연변이체/변이체는 더 이상 Fc γ 또는 F(ab)₂ V_H3와 유의적으로 결합할 수 없으며 (즉, 약화된 또는 차단된 결합 친화력을 증명함) 또한 B 세포 아포토시스를 자극하지 않는다. 이들 비-독소발생성 단백질 A 변이체는 서브유닛 백신으로 사용할 수 있으며 체액성 면역반응을 일으키고 에스. 아우레우스 시험감염에 대해 보호 면역성을 제공한다. 야생형 전체 길이 단백질 A 또는 야생형 SpA-도메인 D와 비교하여 SpA-D 변이체로의 면역화는 단백질 A 특이적 항체의 증가시키는 결과를 제공하였다. 스타필로코커스 시험감염과 농양 발생의 마우스 모델을 이용하여, 비-독소발생성 단백질 A 변이체가 스타필로코커스 감염 및 농양 발생으로부터의 유의적인 방어를 형성하였음이 관찰되었다. 실제로 모든 에스. 아우레우스 균주가 단백질 A를 발현함에 따라, 비-독소발생성 단백질 A 변이체로 사람의 면역화는 이러한 독성 인자를 중화하고, 그럼으로써 보호 면역을 설정할 수 있다. 특정 관점에서, 보호 면역은 USA300 및 다른 MRSA 균주와 같은 스타필로코커스의 약물 내성 균주에 의한 감염을 보호하거나 약화시킨다.

[0019] 양태는 세균 및/또는 스타필로코커스 감염의 치료를 위한 방법 및 조성물에 사용하는 단백질 A 변이체의 용도를 포함한다. 이 용도는 또한 단백질 A 변이체 또는 이의 면역원성 단편을 포함한 면역원성 조성물을 제공한다. 특정 관점에서, 면역원성 단편은 단백질 A 도메인 D 분절이다. 또한, 세균 감염을 치료 (예: 피검체로부터 스타필로코커스 농양 형성 및/또는 지속을 억제함) 또는 예방할 수 있는 방법 및 조성물을 제공한다. 일부 경우에 면역 반응을 자극하는 방법은 단백질 A 변이 폴리펩타이드 또는 항원의 전부 또는 일부를 포함 또는 암호화하는 조성물의 유효량 및 특정 관점으로 다른 세균 단백질을 피검체에게 투여하는 것을 포함한다. 다른 세균 단백질은 이들로 한정되는 것은 아니지만 (i) 분비된 독성 인자 및/또는 세포 표면 단백질 또는 펩타이드 또는 (ii) 분비된 독성 인자 및/또는 세포 표면 단백질을 암호화하는 제조할 핵산 분자를 포함한다.

[0020] 다른 관점에서, 피검체는 단백질 A 변이체의 전부 또는 일부 (예: 변이 단백질 A 도메인 D 분절)를 투여받을 수 있다. 본 발명의 폴리펩타이드는 약제학적으로 허용되는 조성물로 제형화될 수 있다. 조성물은 적어도 또는 많아야 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 또는 19개의 추가적인 스타필로코커스 항원 또는 이의 면역원성 분절 (예: Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla (예: H35 돌연변이체), IsdC, SasF, vWbp 또는 vWh) 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다. 단백질 A 변이체와 배합하여 사용할 수 있는 추가의 스타필로코커스 항원은 이들로 한정되는 것은 아니지만 52kDa 비트로넥틴 결합 단백질 (WO 01/60852), Aaa (GenBank CAC80837), Aap (GenBank 등록번호 AJ249487), Ant (GenBank 등록번호 NP_372518), 오토리신 글루코사미니다제, 오토리신 아미다제, Cna, 콜라겐 결합 단백질 (US6288214), EFB (FIB), 엘라스틴 결합 단백질 (EbpS), EPB, FbpA, 피브리노겐 결합 단백질 (US6008341), 피브로넥틴 결합 단백질 (US5840846), FnbA, FnbB, GehD (US2002/0169288), HarA, HBP, 면역우성 ABC 트랜스포터, IsaA/PisA, 라미닌 수용체, 리파제 GehD, MAP, Mg²⁺ 트랜스포터, MHC II 유사체 (US5648240), MRPII, Npase, RNA III 활성화 단백질 (RAP), SasA, SasB, SasC, SasD, SasK, SBI, SdrF(W000/12689),

SdrG/Fig (WO 00/12689), SdrH (WO 00/12689), SEA 외독소 (WO00/02523), SEB 외독소 (WO 00/02523), SitC 및 Ni ABC 트랜스포터, Sit/MntC/타액 결합 단백질 (US5,801,234), SsaA, SSP-1, SSP-2 및/또는 비트로넥틴 결합 단백질 (PCT 공보 WO 2007/113222, WO 2007/113223, WO 2006/032472, WO 2006/032475, WO 2006/032500)을 포함한다. 상기 각 문헌의 전체 내용은 본원에 참고로 인용된다. 스타필로코커스 항원 또는 면역원성 단편이 단백질 A 변이체와 동시에 투여될 수 있다. 스타필로코커스 항원 또는 면역원성 단편 및 단백질 A 변이체는 동일한 조성물로 투여될 수 있다. 또한, 단백질 A 변이체는 단백질 A 변이체를 암호화하는 재조합 핵산 분자일 수 있다. 재조합 핵산 분자는 단백질 A와 이의 스타필로코커스 항원 또는 면역원성 단편 하나 이상을 암호화할 수 있다. 본원에 사용된 용어 "조절하는" 또는 "조절"은 단어 "증강시키는" 또는 "억제하는"의 의미를 내포한다. 활성의 "조절"은 활성의 증가 또는 감소 중 어느 한쪽 일 수 있다. 본원에 사용된 용어 "조절자"는 단백질, 핵산, 유전자, 유기체 등의 상향조절, 유도, 자극, 강화, 억제, 하향조절 또는 제어를 포함한 잔기의 기능에 영향을 미치는 화합물을 가리킨다.

[0021] 특정 양태에서, 본 발명의 방법 및 조성물은 단백질 A 변이체 또는 항원의 전부 또는 일부를 사용하거나 포함하거나 암호화한다. 다른 관점에서, 단백질 A 변이체는 이들로 한정되는 것은 아니지만 분리된 Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp 또는 vWh 폴리펩타이드 또는 이의 면역원성 단편 중 하나 이상을 포함하는 분리된 인자 또는 표면 항원과 배합하여 사용할 수 있다. 단백질 A 변이체와 배합되어 사용될 수 있는 추가의 스타필로코커스 항원은 이들로 한정되는 것은 아니지만 52kDa 비트로넥틴 결합 단백질 (WO 01/60852), Aaa, Aap, Ant, 오토리신 글루코사미니다제, 오토리신 아미다제, Cna, 콜라겐 결합 단백질 (US6288214), EFB (FIB), 엘라스틴 결합 단백질 (EbpS), EPB, FbpA, 피브리노겐 결합 단백질 (US6008341), 피브로넥틴 결합 단백질 (US5840846), FnbA, FnbB, GehD (US2002/0169288), HarA, HBP, 면역우성 ABC 트랜스포터, IsaA/PisA, 라미닌 수용체, 리파제 GehD, MAP, Mg²⁺ 트랜스포터, MHC II 유사체 (US5648240), MRPII, Npase, RNA III 활성화 단백질 (RAP), SasA, SasB, SasC, SasD, SasK, SBI, SdrF(WO 00/12689), SdrG/Fig (WO 00/12689), SdrH (WO 00/12689), SEA 외독소 (WO 00/02523), SEB 외독소 (WO 00/02523), SitC 및 Ni ABC 트랜스포터, SitC/MntC/타액 결합 단백질 (US5,801,234), SsaA, SSP-1, SSP-2 및/또는 비트로넥틴 결합 단백질을 포함한다. 특정 양태에서 Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp 또는 vWh, 52kDa 비트로넥틴 결합 단백질 (WO 01/60852), Aaa, Aap, Ant, 오토리신 글루코사미니다제, 오토리신 아미다제, Cna, 콜라겐 결합 단백질 (US6288214), EFB (FIB), 엘라스틴 결합 단백질 (EbpS), EPB, FbpA, 피브리노겐 결합 단백질 (US6008341), 피브로넥틴 결합 단백질 (US5840846), FnbA, FnbB, GehD (US2002/0169288), HarA, HBP, 면역우성 ABC 트랜스포터, IsaA/PisA, 라미닌 수용체, 리파제 GehD, MAP, Mg²⁺ 트랜스포터, MHC II 유사체 (US5648240), MRPII, Npase, RNA III 활성화 단백질 (RAP), SasA, SasB, SasC, SasD, SasK, SBI, SdrF(WO 00/12689), SdrG/Fig (WO 00/12689), SdrH (WO 00/12689), SEA 외독소 (WO 00/02523), SEB 외독소 (WO 00/02523), SitC 및 Ni ABC 트랜스포터, SitC/MntC/타액 결합 단백질 (US5,801,234), SsaA, SSP-1, SSP-2 및/또는 비트로넥틴 결합 단백질 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 이상이 본 발명의 제형으로부터 특정적으로 배제될 수 있다.

[0022] 추가의 관점에서, 분리된 단백질 A 변이체는 다량체화 (예: 이량체화)되거나 2개 이상의 폴리펩타이드 또는 펩타이드 분절의 선형 융합체이다. 본 발명의 특정 관점에서, 조성물은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 또는 이상의 분리된 세포 표면 단백질 또는 이의 분절의 다량체 또는 연쇄체를 포함한다. 연쇄체는 하나 이상의 반복 펩타이드 단위를 갖는 선형 폴리펩타이드이다. SpA 폴리펩타이드 또는 절편은 연속적이거나 스페이서 또는 다른 펩타이드 서열 (예: 하나 이상의 추가적인 세균 펩타이드)에 의해 분리되어 있을 수 있다. 추가의 관점에서, 다량체 또는 연쇄체에 함유된 다른 폴리펩타이드 또는 펩타이드는 이들로 한정되는 것은 아니지만 Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp 또는 vWh 또는 이의 면역원성 단편을 포함할 수 있다. 단백질 A 변이체와 배합되어 사용될 수 있는 추가의 스타필로코커스 항원은 이들로 한정되는 것은 아니지만 52kDa 비트로넥틴 결합 단백질 (WO 01/60852), Aaa, Aap, Ant, 오토리신 글루코사미니다제, 오토리신 아미다제, Cna, 콜라겐 결합 단백질 (US6288214), EFB (FIB), 엘라스틴 결합 단백질 (EbpS), EPB, FbpA, 피브리노겐 결합 단백질 (US6008341), 피브로넥틴 결합 단백질 (US5840846), FnbA, FnbB, GehD (US2002/0169288), HarA, HBP, 면역우성 ABC 트랜스포터, IsaA/PisA, 라미닌 수용체, 리파제 GehD, MAP, Mg²⁺ 트랜스포터, MHC II 유사체 (US5648240), MRPII, Npase, RNA III 활성화 단백질 (RAP), SasA, SasB, SasC, SasD, SasK, SBI, SdrF(WO 00/12689), SdrG/Fig (WO 00/12689), SdrH (WO 00/12689), SEA 외독소 (WO 00/02523), SEB 외독소 (WO 00/02523), SitC

및 Ni ABC 트랜스포터, SitC/MntC/타액 결합 단백질 (US5,801,234), SsaA, SSP-1, SSP-2 및/또는 비트로넥틴 결합 단백질 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19개를 포함할 수 있다.

[0023] 용어 "단백질 A 변이체" 또는 "SpA 변이체"는 Fc 및 V_H3과의 결합을 파괴하는 2개 이상의 아미노산 치환을 갖는 SpA IgG 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 가리킨다. 특정 관점에서, SpA 변이체는 비-독소발생성이고 스타필로코커스 세균 단백질 A 및/또는 이를 발현하는 세균에 대해 면역 반응을 자극하는 변이 도메인 D 펩타이드뿐만 아니라 SpA 폴리펩타이드의 변이체 및 이의 분절을 포함한다.

[0024] 본 발명의 양태는 피검체에게 유효량의 단백질 A 변이체 또는 이의 분절을 제공함을 포함하여 피검체에서 스타필로코커스 세균 또는 포도상구균에 대해 면역 반응을 유도하는 방법을 포함한다. 특정한 관점에서 본 발명은 피검체에게 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 그 이상의 분비된 단백질 및/또는 세포 표면 단백질 또는 이의 분절/단편의 유효량을 제공함을 포함하여 스타필로코커스 세균 또는 포도상구균에 대해 면역 반응을 유도하는 방법을 포함한다. 분비된 단백질 또는 세포 표면 단백질은 이들로 한정되는 것은 아니지만 Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp 및/또는 vWh 및 이의 면역원성 단편을 포함한다. 단백질 A 변이체와 배합되어 사용될 수 있는 추가의 스타필로코커스 항원은 이들로 한정되는 것은 아니지만 52kDa 비트로넥틴 결합 단백질 (WO 01/60852), Aaa, Aap, Ant, 오토리신 글루코사미니다제, 오토리신 아미다제, Cna, 콜라겐 결합 단백질 (US6288214), EFB (FIB), 엘라스틴 결합 단백질 (EbpS), EPB, FbpA, 피브리노겐 결합 단백질 (US6008341), 피브로넥틴 결합 단백질 (US5840846), FnbA, FnbB, GehD (US2002/0169288), HarA, HBP, 면역우성 ABC 트랜스포터, IsaA/PisA, 라미닌 수용체, 리파제 GehD, MAP, Mg²⁺ 트랜스포터, MHC II 유사체 (US5648240), MRPII, Npase, RNA III 활성화 단백질 (RAP), SasA, SasB, SasC, SasD, SasK, SBI, SdrF(WO 00/12689), SdrG/Fig (WO 00/12689), SdrH (WO 00/12689), SEA 외독소 (WO 00/02523), SEB 외독소 (WO 00/02523), SitC 및 Ni ABC 트랜스포터, SitC/MntC/타액 결합 단백질 (US5,801,234), SsaA, SSP-1, SSP-2 및/또는 비트로넥틴 결합 단백질을 포함한다.

[0025] 본 발명의 양태는 단백질 A와 동일하거나 유사한 또는 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나 유사한 폴리펩타이드, 펩타이드 또는 단백질 또는 분비된 세균 단백질 또는 세균 세포 표면 단백질인 제2 단백질 또는 펩타이드를 포함하는 조성물을 포함한다. 본 발명의 추가의 양태에서 조성물은 조성물은 단백질 A 도메인 D 폴리펩타이드 (서열번호 2), 도메인 E (서열번호 3), 도메인 A (서열번호 4), 도메인 C (서열번호 5), 도메인 B (서열번호 6)와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나 유사한 폴리펩타이드, 펩타이드 또는 단백질 또는 단백질 A 도메인 D, 도메인 E, 도메인 A, 도메인 C 또는 도메인 B 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 특정 관점에서, 단백질 A 폴리펩타이드 분절은 서열번호 8의 아미노산 서열을 갖는다. 유사성 또는 동일성 (바람직하게는 동일성)은 본 분야에서 잘 알려진 것으로, 많은 다른 프로그램을 사용하여 단백질 (또는 핵산)이 공지된 서열과 서열 상동성 또는 유사성을 갖는지를 확인할 수 있다. 서열 동일성 및/또는 유사성은 본 분야에 공지된 표준 기술을 사용하여 결정하며, 그러한 기술로는 이들로 한정하는 것은 아니지만 스미스 & 워터만의 국부 서열 동일성 알고리즘 (1981), 니들만 & 운쉬의 서열 동일성 정렬 알고리즘 (1970), 피어슨 & 립만의 유사성 방법 조사 (1988), 이들 알고리즘의 컴퓨터 실행법 (위스콘신 매디슨 사이언스 드라이브 575에 소재한 제네틱스 컴퓨터 그룹 제품 위스콘신 제네틱스 소프트웨어 패키지의 GAP, BESTFIT, FASTA 및 TFASTA), 데버록스 등 (1984)에 의해 기술된 베스트 피트 시퀀스 프로그램이 포함되며, 바람직하게는 디폴트 세팅을 이용하거나, 검정을 통해 실행한다. 바람직하게는 동일성 %는 본 분야의 숙련자에게 알려져 있고 용이하게 확인가능한 정렬 틀을 사용하여 계산한다. 동일성 %는 필수적으로 동일한 아미노산의 수를 아미노산의 총 수로 나누고 100을 곱한 값이다.

[0026] 추가의 양태는 피검체에게 (i) SpA 변이체 (예: 변이 SpA 도메인 D 폴리펩타이드 또는 이의 펩타이드) 또는 (ii) 그러한 SpA 변이체 폴리펩타이드 또는 이의 펩타이드를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 조성물의 유효량을 투여하거나 (iii) SpA 변이 도메인 D 폴리펩타이드를 본원에 기술된 세균 단백질과 배합하여 또는 순열로 투여함을 포함하여 스타필로코커스 세균에 대한 예방 또는 치료 면역 반응을 피검체에서 자극하는 방법을 포함한다. 바람직한 양태에서, 조성물은 스타필로코커스 세균이 아니다. 특정 관점에서 피검체는 사람 또는 소이다. 추가의 관점에서, 조성물은 약제학적으로 허용되는 제제로 제형화된다. 포도상구균은 스타필로코커스 아우레우스일 수 있다.

[0027] 또 다른 추가의 양태는 분리된 SpA 변이체 폴리펩타이드 또는 어떠한 다른 조합 또는 순열의 본원에 기술된 단백질 또는 펩타이드를 함유하고 스타필로코커스 세균에 대해 면역 반응을 자극할 수 있는 약제학적으로 허용되

는 조성물을 포함한 백신을 포함한다. 백신은 분리된 SpA 변이체 폴리펩타이드 또는 어떠한 다른 조합 또는 순열의 기술된 단백질 또는 펩타이드를 포함할 수 있다. 본 발명의 특정 관점에서 분리된 SpA 변이체 폴리펩타이드 또는 어떠한 다른 조합 또는 순열의 기술된 단백질 또는 펩타이드는 다량체화, 예를 들어 이량체화 또는 연쇄체화된다. 추가의 관점에서, 백신 조성물은 약 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.05% 미만 (또는 이들 수치내의 모든 범위)의 다른 스타필로코커스 단백질로 오염된다. 조성물은 또한 분리된 비-SpA 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 전형적으로, 백신은 보조제(adjuvant)를 포함할 수 있다. 특정 관점에서, 본 발명의 단백질 또는 펩타이드는 보조제에 공유 또는 비공유로 연결되며, 바람직하게는 보조제는 단백질에 화학적으로 결합된다.

[0028] 또 다른 추가의 양태에서, 백신 조성물은 SpA 변이체 폴리펩타이드의 전부 또는 일부를 암호화하는 재조합 핵산 또는 어떠한 다른 조합 또는 순열의 본원에 기술된 단백질 또는 펩타이드를 함유하고 스타필로코커스 세균에 대해 면역 반응을 자극할 수 있는 약제학적으로 허용되는 조성물이다. 백신 조성물은 SpA 변이체 폴리펩타이드의 전부 또는 일부를 암호화하는 재조합 핵산 또는 어떠한 다른 조합 또는 순열의 본원에 기술된 단백질 또는 펩타이드를 포함할 수 있다. 특정 양태에서, 재조합 핵산은 이중 프로모터를 함유한다. 바람직하게는, 재조합 핵산은 벡터이다. 보다 바람직하게는 벡터는 플라스미드 또는 바이러스 벡터이다. 일부 관점에서, 백신은 핵산을 함유한 재조합 비-스타필로코커스 세균을 포함한다. 재조합 비-스타필로코커스는 살모넬라 또는 다른 그람-양성 세균일 수 있다. 백신은 약제학적으로 허용되는 부형제, 더욱 바람직하게는 보조제를 포함할 수 있다.

[0029] 추가의 양태는 SpA 변이체 폴리펩타이드 또는 이의 분절/단편 및 추가로 Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp 또는 vWh 단백질 또는 이의 펩타이드 중 하나 이상을 함유한 조성물의 유효량을 피검체에게 투여함을 포함하여 스타필로코커스 세균에 대한 예방 또는 치료 면역 반응을 피검체에서 자극하는 방법을 포함한다. 바람직한 양태로, 조성물은 비-스타필로코커스 세균을 포함한다. 추가의 관점에서, 조성물은 약제학적으로 허용되는 제제로 제형화된다. 피검체로부터 치료해야 하는 포도상구균은 스타필로코커스 아우레우스일 수 있다. 본 발명의 방법은 또한 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19개 또는 그 이상의 분비된 독성 인자 및/또는 세포 표면 단백질을, 예를 들어 Eap, Ebh, Emp, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp 또는 vWh를 여러 가지 배합으로 함유하는 SpA 변이체 조성물을 포함한다. 특정 관점에서, 백신 제형은 Eap, Ebh, Emp, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp 및 vWh를 포함한다. 특정 관점에서, 항원 배합은 (1) SpA 변이체와 IsdA; (2) SpA 변이체와 ClfB; (3) SpA 변이체와 SdrD; (4) SpA 변이체와 Hla 또는 Hla 변이체; (5) SpA 변이체와 ClfB, SdrD와 Hla 또는 Hla 변이체; (6) SpA 변이체, IsdA, SdrD와 Hla 또는 Hla 변이체; (7) SpA 변이체, IsdA, ClfB와 Hla 또는 Hla 변이체; (8) SpA 변이체, IsdA, ClfB와 SdrD; (9) SpA 변이체, IsdA, ClfB, SdrD와 Hla 또는 Hla 변이체; (10) SpA 변이체, IsdA, ClfB와 SdrD; (11) SpA 변이체, IsdA, SdrD와 Hla 또는 Hla 변이체; (12) SpA 변이체, IsdA와 Hla 또는 Hla 변이체; (13) SpA 변이체, IsdA, ClfB와 Hla 또는 Hla 변이체; (14) SpA 변이체, ClfB와 SdrD; (15) SpA 변이체, ClfB와 Hla 또는 Hla 변이체; 또는 (16) SpA 변이체, SdrD와 Hla 또는 Hla 변이체를 포함할 수 있다.

[0030] 특정 관점에서, 본 발명의 조성물이 전달된 세균은 연장된 또는 지속적인 성장 또는 농양 형성의 측면에서 제한되거나 약독화된다. 추가의 관점에서, SpA 변이체는 약독화된 세균에서 과발현되어 면역 반응 또는 백신 제제를 추가로 강화 또는 보충할 수 있다.

[0031] 특정 양태는 서열번호 27 또는 이의 분절과 적어도 80, 85, 90, 95, 98 내지 100% 동일하거나 서열번호 32의 아미노산 27-508 또는 이의 분절과 적어도 80, 85, 90, 95, 98 내지 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 코아글라제 폴리펩타이드 또는 이의 면역원성 분절을 포함한 펩타이드의 유효량을 피검체에게 제공함을 포함하여 스타필로코커스 세균에 대한 면역 반응을 유도하는 방법에 관한 것이다.

[0032] 특정 관점에서, (i) 서열번호 27 또는 이의 분절과 적어도 90% 동일하거나 서열번호 32의 아미노산 27-508 또는 이의 분절과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 갖는 분리된 코아글라제 폴리펩타이드 또는 이의 분절; 또는 (ii) 서열번호 27과 적어도 90% 동일하거나 서열번호 32의 아미노산 27-508과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 갖는 코아글라제 폴리펩타이드 또는 이의 분절을 암호화하는 적어도 1개의 분리된 재조합 핵산 분자를 포함하는 조성물을 피검체에게 투여함으로써 유효량의 코아글라제 폴리펩타이드가 피검체에게 제공된다. 추가의 관점에서, 조성물은 서열번호 27의 아미노산 서열 또는 서열번호 32의 아미노산 27-508의 아미노산 서열을 갖는 분리된 코아글라제 폴리펩타이드를 포함한다.

- [0033] 특정 양태는 스타필로코커스에 감염되었거나 의심되는 피검체 또는 스타필로코커스 감염의 발병 위험이 있는 피검체에게 서열번호 27과 적어도 80, 85, 90, 95, 98 내지 100% 동일하거나 서열번호 32의 아미노산 서열 27-508과 적어도 80, 85, 90, 95, 98 내지 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 코아글라제 폴리펩타이드를 포함한 분리된 펩타이드의 유효량을 제공함을 포함하여 피검체에서 스타필로코커스 감염을 치료하는 방법에 관한 것이다. 특별한 관점에서, 코아글라제 폴리펩타이드는 서열번호 27의 아미노산 서열을 갖거나 서열번호 32의 아미노산 27-508과 동일한 아미노산을 갖는다. 특정 관점에서, 피검체는 지속적인 스타필로코커스 감염으로 진단된 상태이다. 추가의 관점에서, 코아글라제 폴리펩타이드는 피검체에서 Coa 또는 vWbpvWh와 결합하는 항체의 생성을 유도한다.
- [0034] 양태는 스타필로코커스 코아글라제 또는 이의 면역원성 분절을 포함한 면역원성 조성물을 투여하는 단계를 포함하여 스타필로코커스 감염을 예방 또는 치료하는 방법을 포함한다.
- [0035] 특정 양태는 수용자를 코아글라제 폴리펩타이드로 면역화하고 수용자로부터 면역글로불린을 분리하는 단계를 포함하여 스타필로코커스 감염의 예방 또는 치료를 위해 사용하기 위한 면역글로불린의 제조 방법에 관한 것이다.
- [0036] 추가의 양태는 본원에 기술된 방법에 의해 제조되는 면역글로불린에 관한 것이다.
- [0037] 추가의 양태는 코아글라제와 결합하는 면역글로불린의 약제의 유효량을 환자에게 투여하는 단계를 포함하여 스타필로코커스 감염을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다.
- [0038] 다른 양태는 스타필로코커스 감염의 치료 또는 예방용 의약을 제조하기 위한 코아글라제 면역글로불린의 약제의 용도에 관한 것이다.
- [0039] 추가의 양태는 분리된 코아글라제 폴리펩타이드 또는 어떠한 다른 조합 또는 순열의 본원에 기술된 단백질 또는 펩타이드를 갖고, 스타필로코커스 세균에 대해 면역 반응을 자극할 수 있는 약제학적으로 허용되는 조성물을 포함한 백신을 포함한다. 백신은 분리된 코아글라제 폴리펩타이드 또는 어떠한 다른 조합 또는 순열의 기술된 단백질 또는 펩타이드를 포함할 수 있다. 본 발명의 특정 관점에서, 분리된 코아글라제 폴리펩타이드 또는 어떠한 다른 조합 또는 순열의 기술된 단백질 또는 펩타이드는 다량체화, 예를 들면 이량체화 또는 연쇄체화된다. 추가의 관점에서 백신 조성물은 약 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.05% 미만 (또는 이들 수치 사이의 모든 범위)의 다른 스타필로코커스 단백질로 오염된다. 조성물은 또한 분리된 비-코아글라제 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 전형적으로, 백신을 보조제를 포함한다. 특정 관점에서, 본 발명의 단백질 또는 펩타이드는 보조제에 공유 또는 비공유적으로 연결되며, 바람직하게는 보조제는 단백질에 화학적으로 결합된다.
- [0040] 추가의 양태에서, 백신 조성물은 코아글라제 폴리펩타이드의 전부 또는 일부를 암호화하는 재조합 핵산 분자 또는 어떠한 다른 조합 또는 순열의 본원에 기술된 단백질 또는 펩타이드를 가지며 스타필로코커스 세균에 대해 면역 반응을 자극할 수 있는 약제학적으로 허용되는 조성물이다. 백신 조성물은 코아글라제 폴리펩타이드의 전부 또는 일부를 암호화하는 재조합 핵산 분자 또는 어떠한 다른 조합 또는 순열의 본원에 기술된 단백질 또는 펩타이드를 포함할 수 있다. 특정 양태에서, 재조합 핵산은 이중 프로모터를 함유한다. 바람직하게는 재조합 핵산은 벡터이다. 더욱 바람직하게는 벡터는 플라스미드 또는 바이러스 벡터이다. 일부 관점에서 백신은 핵산을 함유하는 재조합 비-스타필로코커스 세균을 포함한다. 재조합 비-포도상구균은 살모넬라 또는 다른 그람-양성 세균일 수 있다. 백신은 약제학적으로 허용되는 부형제, 더욱 바람직하게는 보조제를 포함할 수 있다.
- [0041] 추가의 양태는 코아글라제 폴리펩타이드 또는 이의 분절/단편 및 추가로 Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, H1a, IsdC, SasF, vWbp 또는 vWh 단백질 또는 이의 펩타이드 중 하나 이상을 함유한 조성물의 유효량을 피검체에게 투여함을 포함하여 스타필로코커스 세균에 대한 예방 또는 치료 면역 반응을 피검체에서 자극하는 방법을 포함한다. 바람직한 양태로, 조성물은 비-스타필로코커스 세균을 포함한다. 추가의 관점에서, 조성물은 약제학적으로 허용되는 제제로 제형화된다. 피검체로부터 치료해야 하는 포도상구균은 스타필로코커스 아우레우스일 수 있다. 본 발명의 방법은 또한 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19개 또는 그 이상의 분비된 독성 인자 및/또는 세포 표면 단백질, 예를 들어 Eap, Ebh, Emp, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, H1a, IsdC, SasF, SpA 및 이의 변이체, vWbp 또는 vWh를 여러 가지 배합으로 함유하는 코아글라제 조성물을 포함한다. 특정 관점에서, 백신 제제는 Eap, Ebh, Emp, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, H1a, IsdC, SasF, vWbp 및 vWh를 포함한다. 특정 관점에서, 항원 배합은 (1) Coa 및/또는 vWbp와 IsdA; (2) Coa 및/또는 vWbp와 ClfB; (3) Coa 및/또는 vWbp와 SdrD; (4) Coa 및/또는 vWbp와 H1a 또는 H1a 변이체; (5) Coa 및/또는 vWbp와 ClfB, SdrD와 H1a 또는 H1a 변이체; (6) Coa 및/또는 vWbp, IsdA, SdrD와

H1a 또는 H1a 변이체; (7) Coa 및/또는 vWbp, IsdA, ClfB와 H1a 또는 H1a 변이체; (8) Coa 및/또는 vWbp, IsdA, ClfB와 SdrD; (9) Coa 및/또는 vWbp, IsdA, ClfB, SdrD와 H1a 또는 H1a 변이체; (10) Coa 및/또는 vWbp, IsdA, ClfB와 SdrD; (11) Coa 및/또는 vWbp, IsdA, SdrD와 H1a 또는 H1a 변이체; (12) Coa 및/또는 vWbp, IsdA와 H1a 또는 H1a 변이체; (13) Coa 및/또는 vWbp, IsdA, ClfB와 H1a 또는 H1a 변이체; (14) Coa 및/또는 vWbp, ClfB와 SdrD; (15) Coa 및/또는 vWbp, ClfB와 H1a 또는 H1a 변이체; 또는 (16) Coa 및/또는 vWbp, SdrD와 H1a 또는 H1a 변이체를 포함할 수 있다.

- [0042] 용어 "EsxA 단백질"은 스태필로코커스 세균으로부터 분리된 야생형 EsxA 폴리펩타이드 및 이의 분절뿐만 아니라 스태필로코커스 EsxA 단백질에 대해 면역 반응을 자극하는 변이체를 포함하는 단백질을 가리킨다.
- [0043] 용어 "EsxB 단백질"은 스태필로코커스 세균으로부터 분리된 야생형 EsxB 폴리펩타이드 및 이의 분절뿐만 아니라 스태필로코커스 EsxB 단백질에 대해 면역 반응을 자극하는 변이체를 포함하는 단백질을 가리킨다.
- [0044] 용어 "SdrD 단백질"은 스태필로코커스 세균으로부터 분리된 야생형 SdrD 폴리펩타이드 및 이의 분절뿐만 아니라 스태필로코커스 SdrD 단백질에 대해 면역 반응을 자극하는 변이체를 포함하는 단백질을 가리킨다.
- [0045] 용어 "SdrE 단백질"은 스태필로코커스 세균으로부터 분리된 야생형 SdrE 폴리펩타이드 및 이의 분절뿐만 아니라 스태필로코커스 SdrE 단백질에 대해 면역 반응을 자극하는 변이체를 포함하는 단백질을 가리킨다.
- [0046] 용어 "IsdA 단백질"은 스태필로코커스 세균으로부터 분리된 야생형 IsdA 폴리펩타이드 및 이의 분절뿐만 아니라 스태필로코커스 IsdA 단백질에 대해 면역 반응을 자극하는 변이체를 포함하는 단백질을 가리킨다.
- [0047] 용어 "IsdB 단백질"은 스태필로코커스 세균으로부터 분리된 야생형 IsdB 폴리펩타이드 및 이의 분절뿐만 아니라 스태필로코커스 IsdB 단백질에 대해 면역 반응을 자극하는 변이체를 포함하는 단백질을 가리킨다.
- [0048] 용어 "Eap 단백질"은 스태필로코커스 세균으로부터 분리된 야생형 Eap 폴리펩타이드 및 이의 분절뿐만 아니라 스태필로코커스 Eap 단백질에 대해 면역 반응을 자극하는 변이체를 포함하는 단백질을 가리킨다.
- [0049] 용어 "Ebh 단백질"은 스태필로코커스 세균으로부터 분리된 야생형 Ebh 폴리펩타이드 및 이의 분절뿐만 아니라 스태필로코커스 Ebh 단백질에 대해 면역 반응을 자극하는 변이체를 포함하는 단백질을 가리킨다.
- [0050] 용어 "Emp 단백질"은 스태필로코커스 세균으로부터 분리된 야생형 Emp 폴리펩타이드 및 이의 분절뿐만 아니라 스태필로코커스 Emp 단백질에 대해 면역 반응을 자극하는 변이체를 포함하는 단백질을 가리킨다.
- [0051] 용어 "EsaB 단백질"은 스태필로코커스 세균으로부터 분리된 야생형 EsaB 폴리펩타이드 및 이의 분절뿐만 아니라 스태필로코커스 EsaB 단백질에 대해 면역 반응을 자극하는 변이체를 포함하는 단백질을 가리킨다.
- [0052] 용어 "EsaC 단백질"은 스태필로코커스 세균으로부터 분리된 야생형 EsaC 폴리펩타이드 및 이의 분절뿐만 아니라 스태필로코커스 EsaC 단백질에 대해 면역 반응을 자극하는 변이체를 포함하는 단백질을 가리킨다.
- [0053] 용어 "SdrC 단백질"은 스태필로코커스 세균으로부터 분리된 야생형 SdrC 폴리펩타이드 및 이의 분절뿐만 아니라 스태필로코커스 SdrC 단백질에 대해 면역 반응을 자극하는 변이체를 포함하는 단백질을 가리킨다.
- [0054] 용어 "ClfA 단백질"은 스태필로코커스 세균으로부터 분리된 야생형 ClfA 폴리펩타이드 및 이의 분절뿐만 아니라 스태필로코커스 ClfA 단백질에 대해 면역 반응을 자극하는 변이체를 포함하는 단백질을 가리킨다.
- [0055] 용어 "ClfB 단백질"은 스태필로코커스 세균으로부터 분리된 야생형 ClfB 폴리펩타이드 및 이의 분절뿐만 아니라 스태필로코커스 ClfB 단백질에 대해 면역 반응을 자극하는 변이체를 포함하는 단백질을 가리킨다.
- [0056] 용어 "Coa 단백질"은 스태필로코커스 세균으로부터 분리된 야생형 Coa 폴리펩타이드 및 이의 분절뿐만 아니라 스태필로코커스 Coa 단백질에 대해 면역 반응을 자극하는 변이체를 포함하는 단백질을 가리킨다.
- [0057] 용어 "H1a 단백질"은 스태필로코커스 세균으로부터 분리된 야생형 H1a 폴리펩타이드 및 이의 분절뿐만 아니라 스태필로코커스 H1a 단백질에 대해 면역 반응을 자극하는 변이체를 포함하는 단백질을 가리킨다.
- [0058] 용어 "IsdC 단백질"은 스태필로코커스 세균으로부터 분리된 야생형 IsdC 폴리펩타이드 및 이의 분절뿐만 아니라 스태필로코커스 IsdC 단백질에 대해 면역 반응을 자극하는 변이체를 포함하는 단백질을 가리킨다.
- [0059] 용어 "SasF 단백질"은 스태필로코커스 세균으로부터 분리된 야생형 SasF 폴리펩타이드 및 이의 분절뿐만 아니라 스태필로코커스 SasF 단백질에 대해 면역 반응을 자극하는 변이체를 포함하는 단백질을 가리킨다.
- [0060] 용어 "vWbp 단백질"은 스태필로코커스 세균으로부터 분리된 야생형 vWbp (폰빌레브란트 인자 결합 단백질) 폴리

펩타이드 및 이의 분절뿐만 아니라 스타필로코커스 vWbp 단백질에 대해 면역 반응을 자극하는 변이체를 포함하는 단백질을 가리킨다.

- [0061] 용어 "vWh 단백질"은 스타필로코커스 세균으로부터 분리된 야생형 vWh (폰빌레브란트 인자 결합 단백질 동족체) 폴리펩타이드 및 이의 분절뿐만 아니라 스타필로코커스 vWh 단백질에 대해 면역 반응을 자극하는 변이체를 포함하는 단백질을 가리킨다.
- [0062] 면역 반응은 유기체에서 체액성 반응, 세포성 반응 또는 체액성과 세포성 둘 다의 반응을 가리킨다. 면역 반응은 이들로 한정되는 것은 아니지만 단백질 또는 세포 표면 단백질을 특이적으로 인식하는 항체의 존재 또는 양을 측정하는 검정, T-세포 활성화 또는 증식을 측정하는 검정 및/또는 한 가지 이상의 사이토카인의 활성화 또는 발현의 측면에서 조절을 측정하는 검정을 포함하는 검정에 의해 측정할 수 있다.
- [0063] 본 발명의 추가의 양태에서 조성물은 Esx 단백질과 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 또는 그 이상 동일하거나 유사한 폴리펩타이드, 펩타이드 또는 단백질을 포함할 수 있다. 특정 관점에서, EsxA 단백질은 서열번호 11의 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 갖는다.
- [0064] 본 발명의 추가의 양태에서 조성물은 EsxB 단백질과 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 또는 그 이상 동일하거나 유사한 폴리펩타이드, 펩타이드 또는 단백질을 포함할 수 있다. 특정 관점에서, EsxB 단백질은 서열번호 12의 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 갖는다.
- [0065] 본 발명의 추가의 양태에서 조성물은 SdrD 단백질과 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 또는 그 이상 동일하거나 유사한 폴리펩타이드, 펩타이드 또는 단백질을 포함할 수 있다. 특정 관점에서, SdrD 단백질은 서열번호 13의 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 갖는다.
- [0066] 본 발명의 추가의 양태에서 조성물은 SdrE 단백질과 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 또는 그 이상 동일하거나 유사한 폴리펩타이드, 펩타이드 또는 단백질을 포함할 수 있다. 특정 관점에서, SdrE 단백질은 서열번호 14의 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 갖는다.
- [0067] 본 발명의 추가의 양태에서 조성물은 IsdA 단백질과 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 또는 그 이상 동일하거나 유사한 폴리펩타이드, 펩타이드 또는 단백질을 포함할 수 있다. 특정 관점에서, IsdA 단백질은 서열번호 15의 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 갖는다.
- [0068] 본 발명의 추가의 양태에서 조성물은 IsdB 단백질과 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 또는 그 이상 동일하거나 유사한 폴리펩타이드, 펩타이드 또는 단백질을 포함할 수 있다. 특정 관점에서, IsdB 단백질은 서열번호 16의 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 갖는다.
- [0069] 본 발명의 추가의 양태에서 조성물은 EsaB 단백질과 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 또는 그 이상 동일하거나 유사한 폴리펩타이드, 펩타이드 또는 단백질을 포함할 수 있다. 특정 관점에서, EsaB 단백질은 서열번호 17의 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 갖는다.
- [0070] 본 발명의 추가의 양태에서 조성물은 ClfB 단백질과 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 또는 그 이상 동일하거나 유사한 폴리펩타이드, 펩타이드 또는 단백질을 포함할 수 있다. 특정 관점에서, ClfB 단백질은 서열번호 18의 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 갖는다.
- [0071] 본 발명의 추가의 양태에서 조성물은 IsdC 단백질과 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 또는 그 이상 동일하거나 유사한 폴리펩타이드, 펩타이드 또는 단백질을 포함할 수 있다. 특정 관점에서, IsdC 단백질은 서열번호 19의 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 갖는다.
- [0072] 본 발명의 추가의 양태에서 조성물은 SasF 단백질과 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 또는 그 이상 동일하거나 유사한 폴리펩타이드, 펩타이드 또는 단백질을 포함할 수 있다. 특정 관점에서, SasF 단백질은 서열번호 20의 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 갖는다.
- [0073] 본 발명의 추가의 양태에서 조성물은 SdrC 단백질과 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 또는 그 이상 동일하거나 유사한 폴리펩타이드, 펩타이드 또는 단백질을 포함할 수 있다. 특정 관점에서, SdrC 단백질은 서열번호 21의 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 갖는다.
- [0074] 본 발명의 추가의 양태에서 조성물은 ClfA 단백질과 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 또는 그 이상 동일하거나 유사한 폴리펩타이드, 펩타이드 또는 단백질을 포함할 수 있다. 특정 관점에서, ClfA 단백질은 서열번호 22의 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 갖는다.

- [0075] 본 발명의 추가의 양태에서 조성물은 Eap 단백질과 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 또는 그 이상 동일하거나 유사한 폴리펩타이드, 펩타이드 또는 단백질을 포함할 수 있다. 특정 관점에서, Eap 단백질은 서열번호 23의 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 갖는다.
- [0076] 본 발명의 추가의 양태에서 조성물은 Ebh 단백질과 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 또는 그 이상 동일하거나 유사한 폴리펩타이드, 펩타이드 또는 단백질을 포함할 수 있다. 특정 관점에서, Ebh 단백질은 서열번호 24의 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 갖는다.
- [0077] 본 발명의 추가의 양태에서 조성물은 Emp 단백질과 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 또는 그 이상 동일하거나 유사한 폴리펩타이드, 펩타이드 또는 단백질을 포함할 수 있다. 특정 관점에서, Emp 단백질은 서열번호 25의 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 갖는다.
- [0078] 본 발명의 추가의 양태에서 조성물은 EsaC 단백질과 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 또는 그 이상 동일하거나 유사한 폴리펩타이드, 펩타이드 또는 단백질을 포함할 수 있다. 특정 관점에서, EsaC 단백질은 서열번호 26의 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 갖는다. EsaC 폴리펩타이드의 서열은 단백질 데이터베이스에서 찾아 볼 수 있으며, 이들로 한정되는 것은 아니지만 등록번호 ZP_02760162 (GI:168727885), NP_645081.1 (GI:21281993) 및 NP_370813.1 (GI:15923279)를 포함한다. 이들 각각은 본원의 우선권일자로 본 명세서에 참조로 인용된다.
- [0079] 본 발명의 추가의 양태에서 조성물은 Coa 단백질과 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 또는 그 이상 동일하거나 유사한 폴리펩타이드, 펩타이드 또는 단백질을 포함할 수 있다. 특정 관점에서, Coa 단백질은 서열번호 27의 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 갖는다.
- [0080] 본 발명의 추가의 양태에서 조성물은 H1a 단백질과 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 또는 그 이상 동일하거나 유사한 폴리펩타이드, 펩타이드 또는 단백질을 포함할 수 있다. 특정 관점에서, H1a 단백질은 서열번호 28의 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 갖는다.
- [0081] 본 발명의 추가의 양태에서 조성물은 vWa 단백질과 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 또는 그 이상 동일하거나 유사한 폴리펩타이드, 펩타이드 또는 단백질을 포함할 수 있다. 특정 관점에서, vWa 단백질은 서열번호 29의 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 갖는다.
- [0082] 본 발명의 추가의 양태에서 조성물은 vWbp 단백질과 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 또는 그 이상 동일하거나 유사한 폴리펩타이드, 펩타이드 또는 단백질을 포함할 수 있다. 특정 관점에서, vWbp 단백질은 서열번호 32의 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 갖는다.
- [0083] 특정 관점에서, 폴리펩타이드 또는 분절/단편은 참조 폴리펩타이드의 아미노산 서열과 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 또는 그 이상인 서열을 가질 수 있다. 용어 "유사성"은 참조 폴리펩타이드와 동일하거나 참조 폴리펩타이드와 보존 치환을 구성하는 아미노산의 특정 비율을 갖는 서열을 갖는 폴리펩타이드를 가리킨다.
- [0084] 본원에 기술된 폴리펩타이드는 서열번호 2-30 또는 서열번호 32-34의 적어도 또는 많아야 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, 1000개 또는 그 이상의 연속 아미노산 또는 이들 개수 사이의 모든 범위 내에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15개 또는 그 이상의 변이체 아미노산을 포함할 수 있다.

- [0085] 본원에 기술된 폴리펩타이드 분질은 서열번호 2-30 또는 서열번호 33-34의 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, 1000개 또는 그 이상의 연속 아미노산 또는 이들 개수 사이의 모든 범위를 포함할 수 있다.
- [0086] 조성물은 약제학적으로 허용되는 조성물로 제형화될 수 있다. 본 발명의 특정 관점에서 스타필로코커스 세균은 에스. 아우레우스 세균이다.
- [0087] 추가의 관점에서, 조성물은 피검체에게 1회 이상 투여할 수 있고 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20회 또는 그 이상의 횟수로 투여할 수 있다. 조성물의 투여는 이들로 한정되는 것은 아니지만 경구, 비경구, 피하, 근육내, 정맥내 또는 이의 여러 가지 조합 (흡입 또는 흡입을 포함함)을 포함한다.
- [0088] 추가의 양태에서, 조성물은 본원에 기술된 폴리펩타이드 또는 이의 분질/단편을 암호화하는 재조합 핵산 분자를 포함한다. 전형적으로, 본원에 기술된 폴리펩타이드를 암호화하는 재조합 핵산 분자는 이중 프로모터를 함유한다. 특정 관점에서, 본 발명의 재조합 핵산 분자는 벡터이며, 다른 관점에서 벡터는 플라스미드이다. 특정 양태에서 벡터는 바이러스 벡터이다. 특정 관점에서, 조성물은 본원에 기술된 폴리펩타이드를 함유하거나 발현하는 재조합 비-스타필로코커스 세균을 포함한다. 특별한 관점으로, 재조합 비-스타필로코커스 세균은 살모넬라 또는 다른 그람-양성 세균이다. 조성물은 전형적으로 사람 피검체와 같은 포유동물에 투여되지만 면역 반응을 나타낼 수 있는 다른 동물에 투여하는 것이 고려된다. 추가의 관점에서, 폴리펩타이드를 함유하거나 발현하는 스타필로코커스 세균은 스타필로코커스 아우레우스이다. 추가의 양태에서 면역 반응은 보호 면역 반응이다.
- [0089] 추가의 양태에서, 조성물은 Eap, Ehb, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, Spa, vWbp 또는 vWh 단백질 또는 펩타이드 또는 이의 변이체 중 하나 이상의 전부 또는 일부를 암호화하는 재조합 핵산 분자를 포함한다. 본원에 기술된 폴리펩타이드와 배합하여 사용할 수 있는 추가의 스타필로코커스 항원은 이들로 한정되는 것은 아니지만 52kDa 비트로넥틴 결합 단백질 (WO 01/60852), Aaa, Aap, Ant, 오토리신 글루코사미니다제, 오토리신 아미다제, Cna, 콜라겐 결합 단백질 (US6288214), EFB (FIB), 엘라스틴 결합 단백질 (EbpS), EPB, FbpA, 피브리노겐 결합 단백질 (US6008341), 피브로넥틴 결합 단백질 (US5840846), FnbA, FnbB, GehD (US2002/0169288), HarA, HBP, 면역우성 ABC 트랜스포터, IsaA/PisA, 라미닌 수용체, 리파제 GehD, MAP, Mg²⁺ 트랜스포터, MHC II 유사체 (US5648240), MRPII, Npase, RNA III 활성화 단백질 (RAP), SasA, SasB, SasC, SasD, SasK, SBI, SdrF(WO00/12689), SdrG/Fig (WO 00/12689), SdrH (WO 00/12689), SEA 외독소 (WO00/02523), SEB 외독소 (WO 00/02523), SitC 및 Ni ABC 트랜스포터, SitC/MntC/타액 결합 단백질 (US5,801,234), SsaA, SSP-1, SSP-2 및/또는 비트로넥틴 결합 단백질을 포함한다. 특정 관점에서, 세균은 재조합 비-스타필로코커스 세균, 예를 들어 살모넬라 또는 다른 그람-양성 세균이다.
- [0090] 본 발명의 조성물은 전형적으로 사람 피검체에게 투여하지만 스타필로코커스 세균에 대해 면역 반응을 나타낼 수 있는 다른 동물 (특히, 소, 말, 염소, 양 및 기타 가축, 즉 포유동물)에 투여하는 것이 고려된다.
- [0091] 특정 관점에서, 스타필로코커스 세균은 스타필로코커스 아우레우스이다. 추가의 양태에서, 면역 반응은 보호 면역 반응이다. 추가의 관점에서, 본 발명의 방법 및 조성물은 조직 또는 분비선(예: 유선)의 감염, 특히 유방염 및 기타 감염을 예방, 완화, 감소 또는 치료하는데 사용할 수 있다. 다른 방법은 이들로 한정되는 것은 아니지만 감염 징후를 보이지 않는 피검체, 특히 표적 세균에 의해 군락화된 것으로 추정되거나 그런 위험이 있는 피검체, 예를 들어 병원에 입원해 있거나, 치료받고 있거나 회복중에 있어 감염 위험에 있거나 있을 수 있거나 그러한 감염에 민감하거나 민감할 수 있는 환자에서 세균부담을 예방적으로 감소시킴을 포함한다.

[0092] 본 발명의 한 가지 관점에 관하여 논의된 어떠한 양태도 본 발명의 다른 관점에도 적용된다. 특히, SpA 변이체 폴리펩타이드 또는 펩타이드 또는 핵산의 관점에서 논의된 어떠한 양태도 다른 항원, 예를 들어 Eap, Ebh, Emp, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp, vWh, 52kDa 비트로넥틴 결합 단백질 (WO 01/60852), Aaa, Aap, Ant, 오토리신 글루코사미니다제, 오토리신 아미다제, Cna, 콜라겐 결합 단백질 (US6288214), EFB (FIB), 엘라스틴 결합 단백질 (EbpS), EPB, FbpA, 피브리노겐 결합 단백질 (US6008341), 피브로넥틴 결합 단백질 (US5840846), FnbA, FnbB, GehD (US2002/0169288), HarA, HBP, 면역구성 ABC 트랜스포터, IsaA/PisA, 라미닌 수용체, 리파제 GehD, MAP, Mg²⁺ 트랜스포터, MHC II 유사체 (US5648240), MRPII, Npase, RNA III 활성화 단백질 (RAP), SasA, SasB, SasC, SasD, SasK, SBI, SdrF(WO00/12689), SdrG/Fig (WO 00/12689), SdrH (WO 00/12689), SEA 외독소 (WO00/02523), SEB 외독소 (WO 00/02523), SitC 및 Ni ABC 트랜스포터, Sit/MntC/타액 결합 단백질 (US5,801,234), SsaA, SSP-1, SSP-2 및/또는 비트로넥틴 결합 단백질 (또는 핵산)의 관점에서 실시될 수 있으며, 반대의 경우도 마찬가지다. 또한, Eap, Ebh, Emp, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp, vWh, 52kDa 비트로넥틴 결합 단백질 (WO 01/60852), Aaa, Aap, Ant, 오토리신 글루코사미니다제, 오토리신 아미다제, Cna, 콜라겐 결합 단백질 (US6288214), EFB (FIB), 엘라스틴 결합 단백질 (EbpS), EPB, FbpA, 피브리노겐 결합 단백질 (US6008341), 피브로넥틴 결합 단백질 (US5840846), FnbA, FnbB, GehD (US2002/0169288), HarA, HBP, 면역구성 ABC 트랜스포터, IsaA/PisA, 라미닌 수용체, 리파제 GehD, MAP, Mg²⁺ 트랜스포터, MHC II 유사체 (US5648240), MRPII, Npase, RNA III 활성화 단백질 (RAP), SasA, SasB, SasC, SasD, SasK, SBI, SdrF(WO00/12689), SdrG/Fig (WO 00/12689), SdrH (WO 00/12689), SEA 외독소 (WO00/02523), SEB 외독소 (WO 00/02523), SitC 및 Ni ABC 트랜스포터, Sit/MntC/타액 결합 단백질 (US5,801,234), SsaA, SSP-1, SSP-2 및/또는 비트로넥틴 결합 단백질 중 한 가지 이상이 청구된 조성물로부터 특징적으로 배제되는 것이 이해되어야 한다.

[0093] 본 발명의 양태는 세균을 함유하거나 함유하지 않는 조성물을 포함한다. 조성물은 약독화된 또는 생존해 있거나 완전한 스태필로코커스 세균을 포함하거나 포함하지 않을 수 있다. 특정 관점에서, 조성물은 스태필로코커스 세균이 아니거나 스태필로코커스 세균을 함유하지 않는 세균을 포함한다. 특정 양태에서, 세균 조성물은 분리된 또는 재조합 발현된 스태필로코커스 단백질 A 변이체 또는 이를 암호화하는 뉴클레오타이드를 포함한다. 조성물은 분리된 독성 인자 또는 세포 표면 단백질의 관점에서 스태필로코커스 세균을 특이적으로 변이시킴을 포함하는 방식으로 유전자 재조합에 의해 변이된 스태필로코커스 세균일 수 있거나 포함할 수 있다. 예를 들면, 세균은 독성 인자 또는 세포 표면 단백질을 변이되기 전에 발현하는 것보다 더 많이 발현하도록 유전자 재조합에 의해 변이될 수 있다.

[0094] 용어 "분리된"은 목적하는 핵산 또는 폴리펩타이드의 기원이 되는 세포 물질, 세균 물질, 바이러스 물질 또는 배양 배지 (DNA 재조합 기술에 의해 생성된 경우) 또는 화학적 전구체 또는 기타 화학물질 (화학적으로 합성된 경우)이 실제로 유리된 핵산 또는 폴리펩타이드를 가리킨다. 게다가, 분리된 화합물은 피검체에게 분리된 화합물로서 투여될 수 있는 것을 가리킨다. 다시 말해서, 만일 화합물이 컬럼에 부착되어 있거나 아가로즈 겔에 내재되어 있다면 그 화합물은 단순히 "분리된" 것으로 고려되지 않을 수 있다. 게다가, "분리된 핵산 단편" 또는 "분리된 펩타이드"는 단편으로서 천연적으로 존재하지 않고/않거나 전형적으로 작용성 상태에 있지 않는 핵산 또는 단백질 단편이다.

[0095] 폴리펩타이드, 펩타이드, 항원 또는 면역원과 같은 본 발명의 잔기는 보조제, 단백질, 펩타이드, 지지체, 형광 잔기 또는 표지와 같은 다른 잔기에 공유적으로 또는 비공유적으로 접합되거나 연결될 수 있다. 용어 "접합체" 또는 "면역접합체"는 한 잔기가 다른 물질과의 작동적 결합을 정의하기 위해 폭넓게 사용되며, 단순히 의도적으로 작동 결합의 어떤 유형을 가리키기 위한 것이 아니며, 특히 화학적 "접합"에 한정되는 것이 아니다. 재조합 융합 단백질이 특히 고려된다. 본 발명의 조성물은 추가로 보조제 또는 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함할 수 있다. 보조제는 본 발명의 폴리펩타이드 또는 펩타이드에 공유 또는 비공유 결합될 수 있다. 특정 관점에서, 보조제는 단백질, 폴리펩타이드 또는 펩타이드에 화학적으로 결합된다.

[0096] 용어 "제공하는"은 "용도를 위해 공급 또는 제공하는" 통상의 의미를 가리키기 위해 사용된다. 일부 양태에서, 단백질은 이 단백질을 투여함으로써 직접적으로 제공되며, 다른 양태에서는, 단백질은 이 단백질을 암호화하는 핵산을 투여함으로써 효과적으로 제공된다. 특정 관점에서, 본 발명은 핵산, 항원, 펩타이드 및/또는 에피토프의 여러 가지 배합을 포함한 조성물을 고려한다.

[0097] 피검체는 스태필로코커스 감염이 되었거나 (예를 들어, 스태필로코커스 감염으로 진단 받은), 감염된 것으로 의심되거나, 감염의 발병 위험이 있다. 본 발명의 조성물은 항원 또는 에피토프가 의도된 목적을 달성하기에 유

효한 양으로 함유된 면역원성 조성물을 포함한다. 보다 특정적으로, 유효량은 면역 반응을 자극하거나 유도하는데 필요한 또는 감염에 대한 내성, 감염의 완화 또는 감염의 경감을 제공하는데 필요한 활성 성분의 양을 의미한다. 보다 특정한 관점에서, 유효량은 질병 또는 감염의 증상을 예방, 경감 또는 완화시키거나, 치료받는 피검체의 생존을 연장시킨다. 유효량의 결정은 본 분야의 숙련가의 능력 범위안에 있으며, 특히 본원에 제공된 상세한 설명의 측면에서 그러하다. 본 발명의 방법에 사용된 모든 제제의 경우, 유효량 또는 용량은 초기에 시험관내 연구, 세포 배양 및/또는 동물 모델 검정으로부터 측정될 수 있다. 예를 들면, 용량은 목적하는 면역 반응 또는 순환하는 항체 농도 또는 역가를 달성하는 정도로 동물 모델에서 제형화될 수 있다. 이러한 제형은 사람에게 유용한 용량을 더욱 정확하게 결정하기 위해 사용할 수 있다.

- [0098] 실시예에서의 양태는 본 발명의 모든 관점에 적용할 수 있는 본 발명의 양태인 것으로 이해된다.
- [0099] 특허청구범위에서 용어 "또는"은 비록 상세한 설명이 유일한 대안 및 "및/또는"을 가리키는 정의를 지지할지라도, 유일한 대안을 의미하거나 대안이 상호 배타적임을 나타내도록 명확히 표기되지 않는 한 "및/또는"를 의미하기 위해 사용한다. 또한, 용어 "또는"을 사용하여 수록된 어떠한 것도 특정적으로 배제될 수도 있음이 고려된다.
- [0100] 본 명세서 전반에 걸쳐 용어 "약"은 어떤 값을 결정하기 위해 사용된 장치 또는 방법에서 그 값이 표준 편차를 포함함을 표기하기 위해 사용된다.
- [0101] 특허법의 오랜 역사에 비추어, 특허청구범위 또는 명세서에서 단어 "포함하는"과 연관되어 사용되는 단수 표기는 특정적으로 표기되지 않으면 복수를 나타낸다.
- [0102] 본 발명의 다른 목적, 특징 및 장점은 아래의 상세한 설명으로부터 명백하다. 그러나, 상세한 설명 및 특정 실시예는 이들로부터 본 발명의 취지 및 범위내에서 다양한 변화 및 변형이 본 분야의 숙련가에게 명백하기 때문에 본 발명의 특정 양태를 나타내는 한편 단지 예시하는 수단으로 제공된 것임을 이해하여야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0103] 본 발명의 상기된 특징, 장점 및 목적뿐만 아니라 명백해질 기타가 달성되고 세밀히 이해될 수 있도록 상기 요약된 본 발명에 대한 보다 특별한 설명 및 특정한 양태가 첨부된 도면을 통해 예시된다. 이들 도면은 명세서의 일부를 형성한다. 그러나, 첨부된 도면은 본 발명의 특정 양태를 예시하는 것이므로 본 발명의 범위를 한정하는 것으로 고려되어서는 안된다.

도 1A-1E. 비-독소발생성 단백질 A 백신의 생성. 도 1A는 N-말단 신호 펩타이드 (백색 박스), 5개의 면역글로불린 결합 도메인 (IgBD E, D, A, B 및 C), 가변 영역 X 및 C-말단 분류 신호 (검정 박스)를 갖는 에스. 아우레우스 뉴만 및 USA300 LAC의 전사 단백질 A (SpA) 생성물을 보여준다. 도 1B는 삼중 α-나선 번들 (H1, H2 및 H3)뿐만 아니라 글루타민 (Q) 9, 10 및 아스파르테이트 (D) 36, 37의 위치가 표기되어 있는 5개 IgBD뿐만 아니라 무독소발생성 SpA-D_{KKAA}의 아미노산 서열을 보여준다. 도 1C는 사람 면역글로불린 (hIgG)의 존재 또는 부재 하에 Ni-NTA 세파로즈 상에서 정제된 SpA, SpA-D, SpA-D_{KKAA} 또는 SrtA의 쿠마시 블루-염색된 SDS-PAGE를 보여준다. 도 1D는 사람 IgG뿐만 아니라 이의 Fc 또는 F(ab)₂ 단편 및 폰빌레브란트 (vWF)와 고정된 SpA, SpA-D 또는 SpA-D_{KKAA}의 결합을 검사한 ELISA를 보여준다. 도 1E는 모의 면역화되었거나 SpA-D 또는 SpA-D_{KKAA}로 처리된 BALB/c 마우스의 비장 조직내의 CD19+ B 림프구가 FACS에 의해 정량된 결과를 보여준다.

도 2. 비-독소발생성 단백질 A 백신은 농양 형성을 예방한다. 모의 면역화된 (PBS) 또는 SpA, SpA-D뿐만 아니라 SpA-D_{KKAA}로 백신접종되고 에스. 아우레우스 뉴만으로 시험감염된 BALB/c 마우스의 부검동안에 분리된 비장 조직의 조직병리. 박편된 조직은 헤마톡실린-에오신으로 염색되었다. 백색 화살표는 다형핵 백혈구 (PMN) 침윤물을 가리킨다. 흑색 화살표는 스타필로코커스 농양 군집을 가리킨다.

도 3A-C는 비-독소발생성 단백질 A 백신에 의해 발생된 항체는 SpA의 B 세포 초항원 기능을 차단하는 결과를 보여준다. 도 3A는 SpA-D_{KKAA}에 대해 발생된 토끼 항체가 고정된 항원을 가진 매트릭스에서 정제되고 쿠마시 블루-염색된 SDS-PAGE에 의해 분석된 결과를 보여준다. 항체를 펩신으로 절단하고 F(ab)₂ 단편을 SpA-D_{KKAA} 매트릭스 상에서 제 2 라운드의 친화성 크로마토그래피로 정제하였다. 도 3B는 SpA-D_{KKAA} 특이적 F(ab)₂가 사람 면역글로불린 (hIgG)에 SpA 또는 SpA-D의 결합을 방해하는 결과를 보여주며, 도 3C는 폰빌레브란트 인자 (vWF)에의 결합을 방해하는 결과를 보여준다.

도 4A-D는 전체 길이 비-독소발생성 단백질 A가 개량된 면역 반응을 생성함을 보여준다. 도 4A는 전체 길이 Sp_{AKKAA}가 Ni-NTA 세파로즈상에서 정제하고 쿠마시-블루 염색된 SDS-PAGE에 의해 분석된 결과를 보여준다. 도 4B는 모의 면역화되었거나 SpA 또는 Sp_{AKKAA}로 처리된 BALB/c 마우스의 비장 조직내의 CD19+ B 림프구가 FACS에 의해 정량된 결과를 보여준다. 도 4C는 사람 IgG뿐만 아니라 이의 Fc 또는 F(ab)₂ 단편 또는 폰빌레브란트 인자 (vWF)와 고정된 SpA 또는 Sp_{AKKAA}의 결합을 검사한 ELISA의 결과를 보여준다. 도 4D는 디프테리아 독소이드 (CRM197) 및 비-독소발생성 Sp_{AKKAA} 또는 SpA-D_{KKAA}에 대한 사람 또는 마우스 혈청 항체 역가를 보여준다. DTaP 면역화 및 스타필로코커스 감염의 이력을 갖는 사람 지원자 (n=16) 뿐만 아니라 에스. 아우레우스 뉴만 또는 USA 300 LAC로 감염되었거나 Sp_{AKKAA} 또는 SpA-D_{KKAA}로 면역화된 마우스 (n=20)가 정량 도트 블롯에 의해 검사된 결과를 보여준다.

도 5는 마우스에서 치명적인 에스. 아우레우스 감염의 발병을 위해 단백질 A가 필요하다는 것을 보여준다. BALB/c 마우스 코호트 (n=8)에 PBS 중의 2×10^8 CFU 에스. 아우레우스 뉴만 또는 이의 동질유전자형 단백질 A 결실 변이체 (Δ spa)의 현탁액을 주사하였다. 감염된 동물을 15일간에 걸쳐 생존에 대해 모니터링하였다.

도 6A-B는 단백질 A에 대한 항체가 치명적인 에스. 아우레우스 감염에 대해 마우스를 보호함을 보여준다. 도 6A의 경우, BALB/c 마우스 코호트(n=10)가 Sp_{AKKAA} (α -Sp_{AKKAA})에 대해 특이적인 5 mg kg^{-1} 친화성 정제된 토끼 IgG 또는 플라그 백신 항원 rV10 (DeBord et al., 2006)(모의)로 주사되었다. 4시간 후 각 동물은 복강내 주사에 의해 3×10^8 CFU 에스. 아우레우스 뉴만의 현탁액으로 감염되고 10일간에 걸쳐 생존에 대해 모니터링되었다. 데이터는 3회 독립 실험을 대표한 값이다. 도 6B의 경우, BALB/c 마우스 코호트(n=10)가 Sp_{AKKAA} 또는 PBS/보조제 대조군 (모의)으로 초기-접종 면역화되었다. 각 동물은 복강내 주사에 의해 6×10^8 CFU 에스. 아우레우스 뉴만의 현탁액으로 순차적으로 감염되었고 10일간에 걸쳐 생존에 대해 모니터링되었다. 통계적 유의성 (P)은 짝지워지지 않은 양측 로그 순위 검정으로 분석되었다. 데이터는 모두 3회 독립 실험을 대표한 값이다.

도 7는 Sp_{AKKAA} 면역화가 반코마이신-내성 MRSA 분리된 Mu50으로 시험감염한 마우스를 보호한다. BALB/c 마우스 코호트(n=15)는 Sp_{AKKAA} 또는 PBS/보조제 대조군 (모의)으로 초기 접종 면역화되었다. 각 동물은 정맥내 주사에 의해 3×10^7 CFU 에스. 아우레우스 Mu50으로 순차적으로 주사되었다. 감염 후 4일 경과하여 균질화된 신장 조직에서 \log_{10} CFU g^{-1} 로 계산된 스타필로코커스 부하가 결정되었다. 통계적 유의성은 기록된 짝지워지지 않은 양측 스튜던츠 t-검정으로 계산하고 P 값을 기록하였다.

도 8A-B는 스타필로코커스 감염에 대한 방어 면역 반응의 결여를 보여준다. 도 8A의 경우, 스타필로코커스 감염은 방어 면역성을 발생하지 않는다. BLAB/c 마우스 (n=10)가 30일간 에스. 아우레우스 뉴만으로 감염되었거나 PBS로 모의 시험감염되었고 클로람페니콜 처리로 감염이 제거되었다. 그런 다음 두 동물 코호트는 에스. 아우레우스 뉴만으로 시험감염되었고 4일째 부검하여 신장 조직 균질화물 중의 세균 부하 (CFU)가 분석되었다. 데이터는 3회 독립 분석을 대표하는 값이다. 도 8B의 경우, IsdB 면역화는 에스. 아우레우스 USA300 (LAC) 시험감염에 마우스를 보호하지 못함을 보여준다. BALB/c 마우스 (n=10)는 IsdB로 면역화되었고 (CFA 중에 현탁된 $100 \mu\text{g}$ IsdB에 이어서 11일째 IFA/IsdB 촉진제) 21일째에 5×10^6 CFU 에스. 아우레우스 USA300 (LAC)로 후안 주사에 의해 시험감염되었다. 시험감염 후 4일 경과하여, 부검 동안에 신장을 제거하고 균질화된 조직의 그램 당 스타필로코커스 부하를 한천 플레이트상의 콜로니 형성으로써 수치화하였다. $6.93 (\pm 0.24) \log_{10}$ CFU g^{-1} 인 모의 면역화된 (PBS/보조제) 동물과 비교하여, IsdB 백신접종은 $6.25 (\pm 0.46) \log_{10}$ CFU g^{-1} 를 나타냈고 USA300 (LAC) 시험감염으로부터 통계적으로 유의적인 보호 (P=0.2138, 양측 스튜던츠 t-검정)를 발생하지 못했다. 데이터는 3회 독립 분석을 대표한 값이다.

도 9는 PBS, SpA, SpA-D 및 SpA-D_{KKAA}로 처리된 마우스에서의 비교된 농양 형성을 보여준다.

도 10A-10H는 스타필로코커스 농양내에 프로트롬빈, 피브리노겐, 코아굴라제(Coa) 및 폰빌레브란트 인자 결합 단백질 (vWbp)의 편재를 보여준다. 정맥내 접종에 의해 1×10^7 CFU 에스. 아우레우스 뉴만으로 감염된 BALB/c 마우스가 감염 후 5일째 사망하였다. 신장을 제거하고, 파라핀에 고정한 다음, 박편한 후, 마우스 프로트롬빈

(도 10A, 10C), 마우스 피브리노겐/피브린 (도 10B, 10D), 에스. 아우레우스 Coa (도 10E, 10G) 또는 에스. 아우레우스 vWbp (도 10F, 10H)에 특이적인 토끼 항체 (α)를 사용하여 면역화학으로 염색하였다. 제시된 이미지는 3회 신장 샘플을 대표한다. 패널 도 10C, 10D, 10G 및 10H는 백색 가장자리의 표시된 패널 도 10A, 10B, 10E 및 10F에서 한 영역으로부터 확장된 4개의 연속 단편으로 분석된 단일 농양내의 항체 염색을 예시한다.

도 11A-11C. 스타필로코커스 아우레우스 coa 및 vWbp 돌연변이체는 혈액 응고에서 결점을 보여준다. (도 11A) 신호 펩타이드 (S), 프로트롬빈 결합으로부터의 D1 및 D2 도메인, 알려지지 않은 기능의 도메인, vWbp상의 폰빌레브란트 인자(vWF) 결합 부위 및 Coa의 피브리노겐 결합 반복체 (R)을 포함한 coa 및 vWbp의 일차 해독 산물을 예시하는 다이어그램. (도 11B) 에스. 아우레우스 뉴만 (야생형) 또는 coa 유전자가 결실된 (Δcoa), vWbp 유전자가 결실된 ($\Delta vWbp$) 또는 두 유전자 모두 결실된 (Δcoa , $\Delta vWbp$) 동질유전자형 변이체의 배양 상청액을 Coa (αCoa) 또는 vWbp ($\alpha vWbp$)에 특이적인 항체로 면역블롯팅하여 검사하였다. 보체 연구를 위해, coa(pcoa) 또는 vWbp(pvWbp)의 야생형 대립유전자를 발현하는 플라스미드를 전기천공에 의해 스타필로코커스 균주내로 도입하고 이어서 면역블롯팅에 의해 분석하였다. (도 11C) 레피루딘-처리된 마우스 혈액을 모의 처리하거나 에스. 아우레우스 뉴만 또는 이의 동질유전자형 코아글라제 변이체로 감염시키고, 25°C에서 48시간 동안 배양하였다. 튜브를 경사시켜 응고를 평가하였다. 데이터는 4회 독립 측정을 대표하는 것이다.

도 12A-12R는 마우스 혈액 중의 세균 생존 및 에스. 아우레우스 유도된 치명적인 세균감염증에 대한 coa 및 vWbp의 기여를 보여준다. (도 12A) 스타필로코커스 균주 뉴만, Δcoa , $\Delta vWbp$ 또는 Δcoa , $\Delta vWbp$ 및 보체화된 변이체를 레피루딘 항응고된 마우스 혈액과 30분간 배양하고 한천 플레이트상의 콜로니 형성에 의해 세균 생존을 평가하였다. 데이터는 3회 독립 시험으로부터 얻었다. (도 12B) 10 마리 마우스 코호트에 1×10^8 CFU의 에스. 아우레우스 뉴만 (야생형)뿐만 아니라 Δcoa , $\Delta vWbp$ 또는 Δcoa , $\Delta vWbp$ 를 후안신경총내로 주사하였다. 10 일간에 걸쳐 시간 경과에 따른 동물 생존을 기록하였다. B와 유사하게, 마우스에 1×10^7 CFU의 스타필로코커스 균주 뉴만 (도 12C, E 및 K, M), $\Delta vWbp$ (도 14D, F 및 M, L), Δcoa (도 14G, I 및 O, Q) 또는 Δcoa , $\Delta vWbp$ (도 12H, J 및 P, R)을 투여하고, 5일째 (도 12C-J) 또는 15일째 (도 12K-R) 수거한 다음, 신장 조직의 세균 부하 (표 7) 및 조직병리학적 농양 형성을 평가하였다. 모든 동물 데이터는 2회 독립 실험을 대표하는 것이다.

도 13A-13D는 Coa 및 vWbp에 대한 항체가 스타필로코커스 코아글라제에 의한 혈액 응고를 차단함을 보여준다. (도 13A) His₆-Coa 및 His₆-vWbp을 이. 콜라이로부터 친화성 크로마토그래피에 의해 정제하고 쿠마시-염색된 SDS-PAGE로 분석하였다. (도 13B) His₆-Coa 또는 His₆-vWbp에 대해 생성된 토끼 항체를 친화성 정제하고, 정제된 코아글라제와의 면역 반응성에 대해 ELISA로 분석하였다. 데이터는 3회 독립 실험 측정값의 평균치이다. (도 13C) 레피루딘-처리된 마우스 혈액을 에스. 아우레우스 뉴만으로 감염시키기 전에 PBS (모의), 무관한 항체 ($\alpha V10$) 또는 Coa (αCoa), vWbp ($\alpha vWbp$) 또는 이들 두 코아글라제 모두 ($\alpha Coa/\alpha vWbp$)에 대한 항체로 처리하고 25°C에서 48시간 동안 배양하였다. (도 13D) 레피루딘-처리된 마우스 혈액을 상기한 바와 같이 항체로 처리하였다. 이어서, 혈액 시료를 기능적으로 활성적인 Coa 또는 vWbp와 배양하고 응고 시간을 기록하였다.

도 14A-14F는 스타필로코커스 코아글라제에 대한 항체의 생물학적 효과를 보여준다. Coa 또는 vWbp와 프로트롬빈 또는 피브리노겐사이의 결합을 방해하는 항체의 표면 플라스몬 공명 측정. 코아글라제 (Coa)를 프로트롬빈 (도 14A) 또는 피브리노겐 (도 14B)에 첨가했을 때의 반응 차이를 증가량의 항체 (αCoa - 1:1, 1:2, 1:4, 1:8) 존재하에 반응 차이와 비교하였다. vWbp를 프로트롬빈 (도 16A) 또는 피브리노겐 (도 16B)에 첨가했을 때의 반응 차이를 증가량의 항체 ($\alpha vWbp$ - 1:1, 1:2, 1:4, 1:8) 존재하에 반응 차이와 비교하였다. (도 14E, F) 정제된 활성 Coa 또는 vWbp를 사람 프로트롬빈과 1:1 몰비로 배양하였다. 복합체의 효소능을 S-2238 분해율 (과량으로 적용되는 피브리노겐 치환 발색 기질)을 모니터링하여 평가하였다. 이 검정은 3M 과량으로 첨가된 특이적 또는 교차 항체의 존재하에 반복하였고, 데이터는 억제없는 평균 활성%로 정성하였다. 데이터는 3회 독립 시험의 평균치이다.

도 15는 스타필로코커스 세균감염증을 갖는 마우스의 생존에 코아글라제 특이적 항체의 기여를 보여준다. 감염 24시간 전에 BALB/c 마우스 (n=15)에 정제된 토끼 항체 (5 mg 항체/체중 kg)를 복강내로 주사하였다. 이어서, 동물의 후안신경총내로 1×10^8 CFU 에스. 아우레우스 뉴만을 주사하여 시험감염시키고 생존에 대해 모니터링하였다. 데이터는 2회 독립 실험의 평균치이다.

도 16A-16H 코아글라제 항체의 수동 전달은 에스. 아우레우스 농양 형성에 대해 방어를 제공한다. 모의 실험용 PBS (도 18A 및 18C) 또는 vWbp ($\alpha vWbp$, 도 18B 및 18D), Coa (αCoa , 도 18E 및 18G) 또는 이들 두 코아글라제 ($\alpha Coa/\alpha vWbp$, 도 18F 및 18H)에 대한 정제된 토끼 항체를 BALB/c 마우스 (n=10)의 복강에 주하고 항체 역

가를 ELISA로 분석하였다 (표 8). 후안신경총내로 1×10^7 CFU 에스. 아우레우스 뉴만을 주입하여 수동적으로 면역화된 동물을 감염시켰다. 감염 후 5일째 사망한 동물의 신장을 부검하여 세균 부하 및 농양 형성을 측정하였다. 신장 조직을 파라포름알데하이드로 고정하고, 파라핀에 포매시킨 다음, 박편화하고, 헤마톡실린-에오신으로 염색한 후 광학 현미경으로 조직병리 이미지를 확보하였다. 데이터는 2회 독립 실험의 평균치이다.

도 17A-17H는 코아골라제로의 면역화가 에스. 아우레우스 농양 형성에 대해 마우스를 방어함을 보여준다. BALB/c 마우스 (n=15)를 0일 및 11일째에 보조제로 현탁화된 $50 \mu\text{g}$ His₆-Coa, His₆-vWbp, His₆-Coa 및 His₆-vWbp 또는 PBS (모의)로 면역화하고 항체 역가를 21일째에 ELISA로 분석하였다 (표 8). 21일째에 안와후방 플렉서스내로 1×10^7 CFU 에스. 아우레우스 뉴만을 주사하여 동물을 시험감염시켰다. 감염 후 5일 경과하여 사망한 동물의 신장을 부검하여 세균 부하 및 농양 형성을 측정하였다. 신장 조직을 파라포름알데하이드로 고정하고, 파라핀에 포매시킨 다음, 박편화하고, 헤마톡실린-에오신으로 염색한 후 광학 현미경으로 조직병리 이미지를 확보하였다. 데이터는 2회 독립 실험의 평균치이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0104] 스타필로코커스 아우레우스는 사람 피부 및 비공의 편리 공생균이며 혈류, 피부 및 연조직 감염의 주 원인이다 (Klevens et al., 2007). 스타필로코커스 질환의 치사율이 최근에 급격히 증가하는 것은 항체에 흔히 민감하지 않은 메티실린-내성 에스. 아우레우스 (MRSA) 균주의 전파에 기인한다 (Kennedy et al., 2008). 과거 대규모 연구에 따르면 MRSA 감염의 발생은 미국내 모든 병원 입원중 4.6%였다 (Klevens et al., 2007). 미국내 94,300 MRSA 감염자를 위한 연 건강보호 비용은 24억달러가 넘는다 (Klevens et al., 2007). 현 MRSA 전염은 공중 건강을 위기로 몰아넣었고 이에 예방 백신의 개발이 절대 필요하다 (Boucher and Corey, 2008). 지금까지 에스. 아우레우스 질환을 예방하는 백신이 FDA 허가를 받아 이용되고 있는 것이 없다.

[0105] 본원에서 본 발명자들은 포도상구균의 세포벽 고정된 표면 단백질인 단백질 A를 서브유닛 백신으로서 역할을 할 수 있는 변이체의 생성에 사용하는 것을 기술한다. 스타필로코커스 감염의 발병은 세균이 외상, 수술상처 또는 의도기를 통해 피부 또는 혈류에 침투하면서 시작된다 (Lowy, 1998). 비록 침입한 병원체가 식세포화되어 사멸될 수 있지만, 포도상구균 또한 선천 면역 방어를 피하고 기관 조직에 감염을 전파하여 대식세포, 호중구 및 다른 식세포를 유인하는 염증 반응을 유도할 수 있다 (Lowy, 1998). 감염 부위에 면역 세포의 반응 침투는 숙주가 스타필로코커스 전파의 예방을 모색하고 피사 조직 파편의 제거를 인정함에 따라 액화 피사를 수반한다 (Lam et al., 1963). 이러한 병소는 피사 조직, 백혈구 및 세균의 중점적인 병소를 포함한 과세포 지역으로서 현미경으로 관찰될 수 있다 (Lam et al., 1963). 스타필로코커스 농양이 수술로 제거되고 항생제로 치료되지 않으면, 과중 감염 및 패혈증이 치명적인 결과를 유발한다 (Sheagren, 1984).

[0106] III. 스타필로코커스 항원

[0107] A. 스타필로코커스 단백질 A (SpA)

[0108] 모든 스타필로코커스 아우레우스 균주는 세포벽 고정된 표면 단백질 산물 (SpA)가 다섯 가지의 고도 상동성 면역글로불린 결합 도메인 E, D, A, B 및 C (Sjodahl, 1977)를 갖는 잘 성장확인된 병독성 인자인 단백질 A의 구조 유전자 (spa) (Jensen, 1958; Said-Salim et al., 2003)를 발현한다. 이들 도메인은 아미노산 수준에서 약 80% 동일성을 나타내고, 길이가 56 내지 61개 잔기로 이루어져 있으며, 텐덤 반복체로 구성되어 있다 (Uhlen et al., 1984). SpA는 N-말단 YSIRK/GS 신호 펩타이드 및 C-말단 LPXTG 모티프 분류 신호를 갖는 전구체 단백질로서 합성된다 (DeDent et al., 2008; Schneewind et al., 1992). 세포벽 고정된 단백질 A는 스타필로코커스 표면에 상당히 풍부하게 나타난다 (DeDent et al., 2007; Sjoquist et al., 1972). 면역글로불린 결합 도메인 각각은 3개의 나선 번들로 집합하고 면역글로불린 G (IgG)의 Fc 도메인 (Deisenhofer, 1981; Deisenhofer et al., 1978), IgM의 VH3 중쇄 (Fab) (즉, B 세포 수용체) (Graille et al., 2000), 폰빌레브란트 인자의 A1 도메인 (vWF AI는 혈소판의 리간드이다) (O'Seaghda et al., 2006) 및 기도 상피의 표면 (Gomez et al., 2004; Gomez et al., 2007)에 나타나는 종양 피사 인자 α (TNF- α) 수용체 I (TNFRI) (Gomez et al., 2006)과 결합하는 역평행 α -나선으로 구성된다.

[0109] SpA는 IgG의 Fc 부분과 결합하는 속성을 통해 포도상구균의 호중구 식세포작용을 방해한다 (Jensen, 1958; Uhlen et al., 1984). 게다가, SpA는 폰빌레브란트 인자 AI 도메인과의 결합을 통해 혈관내 응고를 활성화할 수 있다 (Hartleib et al., 2000). 피브리노겐 및 피브로넥틴과 같은 혈장 단백질은 포도상구균 (CifA 및

C1fB)과 혈소판 인테그린 GPIIb/IIIa (O'Brien et al., 2002) 사이의 브릿지로 작용한다. 이 활성은 포도상구균이 GPIb- α 혈소판 수용체 (Foster, 2005; O'Seaghda et al., 2006)를 경유하여 혈소판을 포획할 수 있도록 하는 vWF AI와의 단백질 A 결합을 통해 보충된다. 또한, SpA는 TNFR1과 결합하고 이러한 상호작용은 스타필로코커스 폐렴의 발병에 기여한다(Gomez et al., 2004). SpA는 TRAF2, p38/c-Jun 키나제, 미토겐 활성화 단백질 키나제 (MAPK) 및 Rel-전사 인자 NF-KB의 TNFR1 매개된 활성화를 통해 염증촉진성 신호전달을 활성화한다. SpA 결합은 또한 TNFR1 웨딩을 유도한다. 이 활성은 TNF-전환 효소 (TACE)를 필요로 하는 듯하다 (Gomez et al., 2007). 상기된 모든 SpA 활성은 SpA의 다섯 가지 IgG 결합 도메인을 통해 매개되며, 단백질 A와 사람 IgG1사이의 상호작용을 위한 요건으로서 처음에 규명된 (Cedergren et al., 1993) 동일한 아미노산 치환에 의해 억제될 수 있다.

[0110] SpA는 또한 B 세포 수용체인 VH3 함유 IgM의 Fab 영역을 포획함으로써 B 세포 초항원으로 작용한다 (Gomez et al., 2007; Goodyear et al., 2003; Goodyear and Silverman, 2004; Roben et al., 1995). 정맥내 시험감염 후 스타필로코커스 단백질 A (SpA) 돌연변이는 기관 조직내 스타필로코커스 부하의 감소 및 (본원에 기술된) 농양의 형성능이 현저히 저하됨을 보여준다. 야생형 에스. 아우레우스로 감염 후 농양은 48 시간내에 형성되며, 초기에 다형핵 백혈구 (PMN)의 유입에 의해 드러나서 헤마톡실린-에오신 염색되고 박편된 신장 조직의 광학 현미경에 의해 검출된다. 감염 5일째 농양은 크기가 증가하고, 주변에 호산성 무정형 물질 층 및 PMN의 커다란 커프가 형성된 스타필로코커스의 중심 군락을 덮었다. 조직병리로 농양 병소의 중심뿐만 아니라 건강한 식세포의 맨틀에서 스타필로코커스 병소에 인접하여 PMN의 대량 괴사가 드러났다. 또한, 본 발명자들은 건강한 신장 조직을 감염 병소와 구분해 주는 호산성 가성협막과 경계로서 인접하는 농양 병소의 주변에서 괴사된 PMN의 테두리를 관찰하였다. 단백질 A가 결합된 스타필로코커스 변이체는 농양의 조직병리 특징을 설정할 수 없으며 감염 동안에 제거된다.

[0111] 이전의 연구에서, Cedergren 등 (1993)은 SpA, L17D, N28A, I31A 및 K35A의 B 도메인의 Fc 단편 결합 서브-도메인에서 5가지의 개별적인 치환을 제작하였다. 이들 연구진은 SpA의 1개 도메인과 Fc₁ 사이의 복합체의 삼차원 구조로부터 수집된 데이터를 시험하기 위해 그러한 단백질을 제작하였다. Cedergren 등은 이들 돌연변이가 안정성 및 결합에 미치는 영향을 결정하였지만 백신 항원의 생성을 위한 그러한 치환의 용도를 고려하지 않았다.

[0112] Brown 등 (1998)은 친화성 리간드로서 사용될 경우 보다 적합한 용출 조건의 사용을 허용하는 SpA 기반의 새로운 단백질을 제작하기 위해 고안된 연구를 기술하였다. 연구된 돌연변이는 Q13A, Q14H, N15A, N15H, F17H, Y18F, L21H, N32H 또는 K39H의 단일 돌연변이를 포함한다. 브라운 등은 Q13A, N15A, N15H 및 N32H 치환이 해리 상수 값에서 별 차이를 유도하지 않았으며 Y18F 치환이 야생형 SpA와 비교하여 결합 친화성에서 2배 감소의 결과를 유발한 것으로 보고한다. 또한, 브라운 등은 L21H 및 F17H 치환이 결합 친화성을 각각 5배 및 100배 감소시켰음을 보고한다. 또한, 이들 연구진은 두 개의 탠덤 도메인에서의 유사성 치환을 연구하였다. 따라서, 브라운 등의 연구는 보다 적합한 용출 프로파일을 갖는 SpA를 생성하는 것에 관한 것이므로, 따라서 결합 친화성에서 pH 민감성 변이를 제공하기 위한 His 치환의 용도에 관한 것이다. 브라운 등은 백신 항원으로서의 SpA의 용도에 대해서는 언급하지 않았다.

[0113] Graille 등 (2000)은 SpA의 도메인 D의 결정상 구조 및 사람 IgM 항체의 Fab 단편을 기술하였다. 그레이 등은 결정상 구조의 분석에 의해 Fab 단편과 상호작용하는 D 도메인 아미노산 잔기 Q26, G29, F30, Q32, S33, D36, D37, Q40, N43, E47 또는 L51뿐만 아니라 도메인 D 서브-도메인사이의 계면을 형성하는 아미노산 잔기를 규명하였다. 그레이 등은 이들 두 단백질사이의 분자적 상호작용을 규명하였지만 백신 항원을 생산하는데 상호작용 잔기의 치환을 사용하는 것에 관해서는 어떠한 언급도 없다.

[0114] O'Seaghda 등 (2006)은 도메인 D의 서브 도메인이 vWF와 결합하는 것을 규명하는 연구를 기술하였다. 이들 연구진은 Fc 또는 VH3 결합 서브-도메인에서의 단일 돌연변이, 즉 아미노산 잔기 F5A, Q9A, Q10A, F13A, Y14A, L17A, N28A, I31A, K35A, G29A, F30A, S33A, D36A, D37A, Q40A, E47A 또는 Q32A를 생성하였다. 이들은 vWF가 Fc와 결합하는 동일한 서브-도메인과 결합한다는 것을 발견하였다. 또한, 이들은 vWF와 결합하는데 역할을 하는 도메인 D의 서브-도메인을 규명하였으나, 백신 항원을 생성하는데 상호작용 잔기의 치환을 사용하는 것에 대하여 어떠한 언급도 없었다.

[0115] Gomez 등 (2006)은 F5A, F13A, Y14A, L17A, N21A, I31A, Q32A 및 K35A의 단일 돌연변이를 사용함으로써 TNFR1의 활성화에 역할을 하는 잔기의 확인을 기술하였다. 고메즈 등은 백신 항원을 생성하는데 상호작용 잔기의 치환을 사용하는 것에 대하여 어떠한 언급도 없었다.

- [0116] 다섯 가지 IgG 도메인 (EDCAB) (Sjodahl, 1977)을 갖지만 C-말단 영역 X (Guss et al., 1984)가 결실된 폴리펩타이드인 재조합 친화성 태그된 단백질 A를 재조합 이. 콜라이로부터 정제되어 백신 항원으로서 사용되었다 (Stranger-Jones et al., 2006). IgG의 Fc 부분과 결합하는 SpA의 속성때문에 단백질 A에 대한 특이적 체액성 면역 반응은 측정될 수 없었다 (Stranger-Jones et al., 2006). 본 발명자들은 이러한 난관을 SpA-DQ9,10K;D36,37A의 생성을 통해 극복해 왔다. 재조합 단백질 A (SpA)로 면역화된 BALB/c 마우스는 에스. 아우레우스 균주의 정맥내 시험감염에 대해 유의적인 방어를 나타냈다: 야생형과 비교하여 스태필로코커스 부하의 2.951 로그 감소 ($P > 0.005$; 스튜던츠 t-검정)(Stranger-Jones et al., 2006). SpA 특이적 항체는 농양 형성 전에 식세포 제거를 일으키고/키거나 단백질 A 돌연변이 균주의 감염 동안에 형성되지 않기 때문에 면역세포로부터 스태필로코커스 균락을 분리하는 농양내 상기 호산성 장벽의 형성에 영향을 미칠 수 있다. 다섯 가지 SpA 도메인 (즉, 3개 나선 번들로부터 형성된 도메인 E, D, A, B 및 C) 각각은 유사한 결합 특성을 발휘한다 (Jansson et al., 1998). 도메인 D의 용액상 및 결정상 구조는 별개의 부위에서 비경쟁적 방식으로 단백질 A와 결합하는 Fc 및 VH3 (Fab) 리간드로 및 이들 없이 해결되었다 (Graille et al., 2000). IgG 결합에 연관되는 것으로 알려진 잔기 (FS, Q9, Q10, S11, F13, Y14, L17, N28, I31 및 K35)에서의 돌연변이가 또한 vWF AI 및 TNFR1 결합을 위해 필요하다 (Cedergren et al., 1993; Gomez et al., 2006; O'Seaghda et al., 2006). 반면 VH3 상호작용에 중요한 잔기 (Q26, G29, F30, S33, D36, D37, Q40, N43, E47)은 다른 결합 활성에 영향을 미치지 않는 것으로 보인다 (Graille et al., 2000; Jansson et al., 1998). SpA는 표면에 VH3 계열 연관된 IgM (즉, VH3형 B 세포 수용체)을 발현하는 B 세포의 서브셋을 특이적으로 표적으로 삼는다 (Roben et al., 1995). SpA와 상호작용할 때 이들 B 세포는 증식하고 아포토시스를 진행하여 선천-유사 B 림프구 (가장자리 영역의 B 세포 및 여포성 B2 세포)의 우선적이고 지속적인 결실을 유도한다 (Goodyear et al., 2003; Goodyear et al., 2004).
- [0117] 단백질 A 표면 제시 및 기능의 분자 기반. 단백질 A는 세균 세포질내에서 전구체로 합성되어 스태필로코커스의 세포분열 격막(도 1)인 황단 벽에서 YSIRK 신호 펩타이드를 경유하여 분비된다 (DeDent et al., 2007; DeDent et al., 2008). C-말단 LPXTG 분류 신호의 절단 후, 단백질 A는 소르타제 A에 의해 세균 펩티도글리칸 크로스 브릿지에 고정된다 (Mazmanian et al., 1999; Schneewind et al., 1995; Mazmanian et al., 2000). 단백질 A는 스태필로코커스의 가장 풍부한 표면 단백질이다; 이 분자는 실제로 모든 에스. 아우레우스 균주에서 발견된다 (Cespedes et al., 2005; Kennedy et al., 2008; Said-Salim et al., 2003). 포도상구균은 분열 주기마다 세포벽의 15-20%를 교체한다 (Navarre and Schneewind, 1999). 귀의 하이드롤라제는 펩티도글리칸의 글리칸 가닥과 벽 펩타이드를 절단하며, 그럼으로써 C-말단 세포벽 디사카라이드 테트라펩타이드가 부착된 단백질 A를 세포의 배지내로 방출한다 (Ton-That et al., 1999). 따라서, 생리학적 디자인에 의해, 단백질 A는 세포벽에 고정되고 세균 표면에 나타나지만 또한 숙주 감염 동안 주변 조직내로 방출된다 (Marraffini et al., 2006).
- [0118] 단백질 A는 세균 표면에서 면역글로불린을 포획하며, 이 생화학적 활성은 스태필로코커스가 숙주의 선천 및 후천 면역 반응으로부터 피할 수 있게 한다 (Jensen, 1958; Goodyear et al., 2004). 흥미로운 것은 IgG 결합 도메인을 LPXTG 분류 신호/세포벽 앵커에 묶는 반복 도메인인 단백질 A의 영역 X (Guss et al., 1984)이 아마도 스태필로코커스 게놈의 모의 가변 부분이다 (Said-Salim, 2003; Schneewind et al., 1992). 3개 나선 번들로부터 형성되고 E, D, A, B 및 C로 명명된 단백질 A (SpA)의 다섯 가지 면역글로불린 결합 도메인 각각은 유사한 구조 및 기능 특성을 발휘한다 (Sjodahl, 1977; Jansson et al., 1998). 도메인 D의 용액상 및 결정상 구조는 별개의 부위에서 비경쟁적 방식으로 단백질 A와 결합하는 Fc 및 VH3 (Fab) 리간드로 및 이들 없이 해결되었다 (Graille 2000).
- [0119] 결정상 구조 복합체에서, Fab는 4개 VH 영역 β -가닥으로 구성된 표면을 경유하여 도메인 D의 나선 II 및 나선 III과 상호작용한다 (Graille 2000). 도메인 D의 나선 II의 주요 축은 가닥 방향에 약 50° 로 위치하며 도메인 D의 나선간 부분은 C0 가닥에 가장 근접해 있다. Fab에서 상호작용의 부위는 Ig 경쇄 및 중쇄 불변 영역으로부터 멀리 위치한다. 상호작용은 다음의 도메인 D 잔기와 연관되어 있다: 나선 II의 Asp-36, 나선 II와 나선 III 사이의 루프내 Asp-37 및 Gln-40 및 몇 가지 다른 잔기 (Graille 2000). 양쪽 상호작용 표면은 도메인 D상의 3개 음전하 잔기 및 상호작용에 의해 묻혀있는 2A2 Fab상에 2개 양전하 잔기와 함께 주로 극성 측쇄로 구성되어 두 분자간에 전체적인 정전기적 인력을 제공한다. Fab와 도메인 D사이에 규명된 5개 극성 상호작용중 3개가 측쇄사이에 있다. 염 브릿지가 Arg-H19와 Asp-36사이에 형성되고 2개 수소 결합이 Tyr-H59와 Asp-37사이 및 Asn-H82a와 Ser-33사이에 이루어져 있다. 단백질 A의 5개 모든 IgG 결합 도메인에 Asp-36과 Asp-37이 보존되어 있어 본 발명자들은 이들 잔기를 변이시켰다.
- [0120] Fab 결합에 역할을 하는 SpA-D 부위는 Fc γ 결합을 매개하는 도메인 표면으로부터 구조적으로 격리되어 있다.

도메인 D와 Fc γ 의 상호작용은 나선 I의 잔기와 주로 연관이 있고 나선 II와는 연관성이 작다 (Gouda et al., 1992; Deisenhofer, 1981). 양쪽 복합체에서 미미한 접촉을 이루는 Gln-32를 제외하고, Fc γ 상호작용을 매개하는 잔기는 어떤 것도 Fab 결합에 연관이 없다. 이들 상이한 Ig-결합 부위사이의 공간 관계를 검사하기 위해, 이들 복합체의 SpA 도메인을 중첩시켜 Fab, SpA-도메인 D와 Fc γ 분자사이의 복합체 모델을 만들었다. 이러한 삼차원 모델에서, Fab와 Fc γ 는 어느 한쪽 상호작용의 입체 장에 대한 증거없이 나선 II의 면을 거의 대향하여 샌드위치를 형성한다. 이러한 발견은 작은 크기 (즉, 56-61 aa)에도 불구하고 SpA 도메인이 양쪽 활성을 동시에 나타낼 수 있는지를 증명하고 개개 도메인과 Fab의 상호작용이 비경쟁적이라는 실험상 증거를 설명해 준다. SpA-D와 Fc γ 사이의 상호작용을 위한 잔기는 Gln-9 및 Gln-10이다.

[0121] 대조적으로, 도메인 D상의 IgG의 Fc 부분의 점유는 vWF A1 및 아마도 또한 TNFR1과의 상호작용을 차단한다 (O'Seaghdha et al., 2006). IgG Fc 결합에 필수적인 잔기 (F5, Q9, Q10, S11, F13, Y14, L17, N28, I31 및 K35)의 돌연변이는 또한 vWF A1 및 TNFR1 결합에 필요하다 (O'Seaghdha et al., 2006; Cedergren et al., 1993; Gomez et al., 2006). 반면 VH3 상호작용에 중요한 잔기 (Q26, G29, F30, S33, D36, D37, Q40, N43, E47)은 IgG Fc, vWF A1 또는 TNFR1의 결합 활성에 어떠한 영향도 미치지 않는다 (Jansson et al., 1998; Graille et al., 2000). 단백질 A 면역글로불린 Fab 결합 활성은 V β 3 계열 관련된 IgM을 표면에 발현하는 B 세포의 서브셋을 표적으로 한다. 즉, 이들 분자는 VH3형 B 세포 수용체로 작용한다 (Roben et al., 1995). SpA와 상호작용할 때 이들 B 세포는 급속히 증식한 다음 아포토시스를 실시하여 선천-유사 B 림프구 (즉, 가장자리 영역의 B 세포 및 여포성 B2 세포)의 우선적이고 지속적인 결실을 유도한다 (Goodyear and Silverman, 2004; Goodyear and Silverman, 2003). 순환하는 B 세포의 40% 이상은 단백질 A 상호작용에 의해 표적이 되며 V β 3 계열은 병원체에 대한 예방적 체액성 반응을 제공하는 사람 B 세포 수용체의 가장 큰 계열을 대표한다 (Goodyear and Silverman, 2004; Goodyear and Silverman, 2003). 따라서, 스타필로코커스 초항원 (Roben et al., 1995) 분자 부류 (예: SEB, TSST-1, TSST-2)가 T 세포 수용체와 복합체를 형성하여 숙주 면역 반응을 부적절하게 자극하고 그럼으로써 스타필로코커스 감염의 질병 특징을 촉발하지만(Roben et al., 1995; Tiedemann et al., 1995), 단백질 A는 스타필로코커스 초항원과 유사하게 작용한다 (Roben et al., 1995). 이러한 발견들을 종합해 보면 스타필로코커스 감염을 설정하고 숙주 면역 반응을 조절함에 있어 단백질 A의 역할이 뒷받침된다.

[0122] 요컨대 단백질 A 도메인은 숙주 분자와 결합을 위한 두 개의 상이한 계면을 제시하는 것으로 간주될 수 있으며 단백질 A를 기본으로 한 백신의 어떠한 개발도 숙주 세포 신호전달, 혈소판 응집, 면역글로불린의 격리 또는 B 세포 증식 및 아포토시스의 유도를 방해하는 변이체의 생성을 고려해야 한다. 또한, 그러한 단백질 A 변이체는 상기된 SpA 활성을 차단하고 이중 결합 계면에서 5개 반복 도메인을 점유하는 항체를 유도하는 능력에 대한 백신을 분석하는데 유용하여야 한다. 이 목적은 본 발명에서 처음으로 게재되고 추구되고 있으며 사람에게 안전한 백신으로서 사용할 수 있는 단백질 A 변이체의 생성을 위한 방법이 상세히 기술된다. IgG Fc γ , vWF AI 및 TNFR1 결합을 차단하기 위해, 글루타민 (Q) 9 및 10 [Uhlen et al., 1984에 기술된 바와 같이 SpA 도메인 D로부터 번호 매김]을 돌연변이하고 첫 번째 결합 계면의 리간드 속성이 제거될 거라는 기대로 글루타민 둘 다를 리신으로 치환하였다. IgM Fab VH3 결합을 차단하기 위해, B 세포 수용체와의 결합에 필요한 아스파르테이트 (D) 36 및 37을 돌연변이시켰다. D36 및 D37 둘 다는 알라닌으로 치환되었다. 본 발명에서는 Q9, 10K 및 D36,37A 돌연변이가 재조합 분자 SpA-DQ9,10K;D36,37A로 조합되고 단백질 A의 결합 속성에 대해 시험된다. 또한, SpA-D 및 SpA-DQ9,10K;D36,37A는 마우스 및 토끼로 면역화 연구에 적용되고 [1] 특이 항체 (SpA-D Ab)의 생성; [2] 단백질 A와 이의 4 가지 상이한 리간드 사이의 결합을 차단하는 SpA-D Ab의 능력; 및 [3] 스타필로코커스 감염에 대한 보호 면역을 생성하는 SpA-D Ab의 능력에 대해 분석된다 (아래 실시예 참조).

[0123] B. 스타필로코커스 코아글라제

[0124] 코아글라제는 피브리노겐을 피브린으로 전환하는 스타필로코커스 세균에 의해 생성된 효소이다. Coa 및 vWh는 단백질분해 없이 프로트롬빈을 활성화한다 (Friedrich et al., 2003). 코아글라제-프로트롬빈 복합체는 피브리노겐을 특이 기질로 인식하고 이를 피브린으로 직접 전환시킨다. 활성 복합체의 결정상 구조는 프로트롬빈에 D1과 D2 도메인의 결합 및 형태 변화를 통한 자이모겐에서의 기능적 활성 부위를 유도하는 Ile¹⁶ 포켓내로 Ile1-Val²N-말단의 삽입을 보여주었다 (Friedrich et al., 2003). α -트롬빈의 엑소사이트 I, 피브리노겐 인식 부위 및 프로트롬빈상의 프로엑소사이트 I은 Coa의 D2에 의해 차단된다 (Friedrich et al., 2003). 그러나 사랑체 (Coa·프로트롬빈)₂ 복합체의 결합은 고 친화성으로 새로운 부위에서 피브리노겐과 결합한다 (Panizzi et al., 2006). 이 모델은 응고제 특성 및 코아글라제에 의한 효율적인 피브리노겐 전환을 설명한다 (Panizzi et al.,

2006).

- [0125] 피브리노겐은 커다란 당단백질 (분자량 약 340,000)로서 3쌍의 A α -, B β - 및 γ -쇄가 공유 결합하여 "삼량체의 이량체"를 형성한 것이며, 여기서 A 및 B는 트롬빈 절단에 의해 방출된 피브리노겐타이드를 가리킨다 (Panizzi et al., 2006). 연장된 분자는 3개의 분리된 도메인, 6개 모든 쇠의 N-말단을 함유한 중앙 단편 E 및 주로 B β -와 γ -쇄의 C-말단으로 형성된 2개 플랭킹 단편 D로내로 풀딩한다. 이들 구형 도메인은 긴 삼중-나선 구조에 의해 연결된다. 사람 피브리노겐을 자가-중합화 피브린으로 전환시키는 코아글라제-프로트롬빈 복합체는 순환하는 트롬빈 억제제에 의해 표적이 되지 않는다 (Panizzi et al., 2006). 따라서, 스태필로코커스 코아글라제는 생리학적 혈액 응고 경로를 우회한다.
- [0126] 모든 에스. 아우레우스 균주는 코아글라제 및 vWbp를 분비한다 (Bjerketorp et al., 2004; Field and Smith, 1945). 비록 초기 연구가 스태필로코커스 감염의 발병에 코아글라제의 중요한 역할을 보고하였지만 (Ekstedt and Yotis, 1960; Smith et al., 1947), 분자 유전학적 도구를 이용한 보다 최근의 연구들은 마우스의 심내막염, 피부 농양 및 유방염 모델에서 어떠한 병독성 표현형을 관찰하지 못함으로써 그러한 관점에 이의를 제기하였다 (Moreillon et al., 1995; Phonimdaeng et al., 1990). 완전한 병원성 임상 분리체인 에스. 아우레우스 뉴만의 동질유전자형 변이체가 생성된 한편 (Duthie et al., 1952), 본원에서는 coa 돌연변이체가 사실 마우스의 치명적인 균혈증 및 신장 농양 모델에서 병독성 결함을 나타냄을 기술하고 있다. 본 발명자들의 경험으로 에스. 아우레우스 8325-4는 완전히 병원성이 아니며 이 균주의 돌연변이 병소는 생체내에서 병독성 결함을 드러낼 수 없을 수 있음이 가정된다. 게다가, Coa 또는 vWbp에 대해 발생된 항체는 에스. 아우레우스 뉴만의 발병을 유전자 결함의 영향을 보이는 정도로 차단한다. Coa 및 vWbp는 스태필로코커스 농양 형성 및 치명적인 균혈증에 기여하며 또한 서브유닛 백신에서 예방 항원으로 작용할 수 있다.
- [0127] 생화학적 연구는 Coa 및 vWbp에 대한 항체의 생물학적 가치를 증명한다. 항체는 항원과 결합하고 항원의 응고 인자와의 결합을 차단함으로써 Coa·프로트롬빈 및 vWbp·프로트롬빈 복합체의 형성을 예방한다. 수동 전달 연구는 Coa 및 vWbp 항체에 의한 스태필로코커스 농양 형성 및 치명적인 시험감염에 대한 실험 동물의 방어를 보여주었다. 따라서, Coa 및 vWbp 중화 항체는 스태필로코커스 질병에 대한 면역 예방을 생성한다.
- [0128] 초기 연구에서는 혈액내 식세포작용에 저항하기 위해 코아글라제가 필요하다는 것이 드러났으며 (Smith et al., 1947) 본 발명자들은 레피루딘-처리된 마우스 혈액내에서 Δcoa 돌연변이체에 대한 유사한 표현형을 관찰하였다 (아래 실시예 3 참조). vWbp는 마우스보다 사람 프로트롬빈에 대해 더 고도의 친화성을 나타냄에 따라, 사람 혈액에서 $\Delta vWbp$ 변이체에 대해 동일할 것으로 예상된다. 또한, 농양 병소에서 Coa 또는 vWbp의 발현뿐만 아니라 호산성 가성협착 주변 (스타필로코커스 농양 균락, SAC) 또는 주변 피브린 벽에 그들의 상당한 분포는 분비된 코아글라제가 이들 병소의 설정에 기여함을 제시한다. 이 가설은 시험되었고, 사실 Δcoa 돌연변이체는 농양 설정에 결함이 있었다. Coa 기능을 특이 항체로 차단하는 상응하는 시험은 동일한 효과를 생성하였다. 결과적으로 피브린의 응고는 예방 백신의 개발에 표적이 될 수 있는 스태필로코커스 농양의 설정에 중요한 과정임이 제안된다. Coa 및 vWbp 둘 다는 사람 프로트롬빈에 대한 중첩된 기능때문에 백신 개발에 우수한 후보물질로 고려된다.
- [0129] C. 다른 스태필로코커스 항원
- [0130] 과거 수십년에 걸친 연구는 에스. 아우레우스 외독소, 표면 단백질 및 조절 분자를 중요한 병독성 인자로 확인하였다 (Foster, 2005; Mazmanian et al., 2001; Novick, 2003). 이들 유전자의 조절에 대한 많은 진전이 달성되었다. 예를 들어, 포도상구균은 임계 농도에서 동족 수용체와 결합하고 자가-유도 펩타이드의 분비를 통해 세균 센서스를 수행하여 포스포-릴레이 반응과 많은 외독소 유전자의 전사 활성화를 활성화한다 (Novick, 2003). 스태필로코커스 감염의 발병은 이들 병독성 인자 (분비된 외독소, 외다당류 및 표면 어드헤신)에 의존한다. 스태필로코커스 백신의 개발은 스태필로코커스 침투 기전의 다면 특성에 의해 지장을 받는다. 생 약독화된 미생물이 고도로 효과적인 백신임은 잘 확립되어 있다. 이러한 백신에 의해 유도된 면역 반응은 비-복제 면역원에 의해 생성된 것에 비하여 세기가 더 크고 지속 기간도 더 길다. 이에 대한 한 가지 설명은 생 약독화된 균주가 숙주에서 한정된 감염을 설정하고 천연 감염의 초기 단계를 모사하는 것일 수 있다. 본 발명의 양태는 감염의 완화 또는 면역화에 사용하기 위해 변이 SpA 폴리펩타이드 및 펩타이드뿐만 아니라 그람 양성 세균의 다른 면역원성 세포외 단백질, 폴리펩타이드 및 펩타이드 (분비된 및 세포 표면 단백질 또는 펩타이드 모두를 포함함)를 포함하는 조성물 및 방법에 관한 것이다. 특정 양태로 세균은 스태필로코커스 세균이다. 세포외 단백질, 폴리펩타이드 또는 펩타이드는 이들로 한정되는 것은 아니지만 표적 세균의 분비된 및 세포 표면 단백질을 포함한다.

- [0131] 사람 병원체 에스. 아우레우스는 세균 외막을 지나 두 가지 ESAT-6 유사 단백질인 EsxA 및 EsxB를 분비한다 (Burts et al., 2005, 이의 내용은 본원에 참조로 인용된다). 스태필로코커스 esxA 및 esxB는 다른 6개 유전자와 클러스터를 이루고 있다 (전사 순서로 esxA esaA essA esaB essB essC esaC esxB). 약어 eas, ess 및 esx는 암호화된 단백질이 분비를 위해 액세서리 (esa) 또는 직접 (ess) 역할을 발휘하거나 세포외 환경에 분비 (esx) 되는지 여부에 따라 각각 ESAT-6 분비 액세서리, 시스템 및 세포외를 의미한다. 8개 유전자의 전체 클러스터는 본원에서 Ess 클러스터로 언급된다. esxA, esxB, esaA, esaB 및 esaC 모두는 EsxA 및 EsxB의 합성 또는 분비를 위해 필요하다. EsxA, EsxB 및 EssC를 생성하지 못하는 돌연변이체는 에스. 아우레우스 쥐 농양의 발병에 결함을 보인다. 이것은 그와 같이 특화된 분비 시스템이 사람 세균 발병의 일반적인 전략일 수 있음을 시사한다. ESX-1 경로에 의한 비-WXG100 기질의 분비가 EspA, EspB, Rv3483c 및 Rv3615c를 포함한 수 가지 항원에 대해 보고되어 왔다 (Fortune et al., 2005; MacGurn et al., 2005; McLaughlin et al., 2007; Xu et al., 2007). 또한 병원성 마이크로박테리아에서 WXG100과 비-WXG100 단백질 모두를 분비하는 다른 ESX-5 경로가 제시되어 왔다 (Abdallah et al., 2007; Abdallah et al., 2006).
- [0132] 스태필로코커스 아우레우스 Ess 경로는 특화된 수송 성분 (Ess), 액세서리 인자 (Esa) 및 동족 분비 기질 (Esx)로 구비된 분비 모듈로 간주될 수 있다. EssA, EssB 및 EssC는 EsxA 및 EsxB 분비에 필요하다. EssA, EssB 및 EssC는 막관통 도메인인 것으로 추정되기 때문에, 이들 단백질은 분비 장치를 형성하는 것으로 고려된다. ess 유전자 클러스터에서 그들 단백질 중 일부는 분비된 기질을 활성적으로 수송할 수 있는 (모터로 작용하는) 한편 다른 일부는 수송을 조절할 수 있다 (조절자). 조절은 달성될 수 있으나 이들로 한정되는 것은 아니지만 분비된 폴리펩타이드를 위한 전사 또는 해독 후 기전, 정해진 위치 (예: 세포외 배지 또는 숙주 세포)로의 특이 기질의 분류 또는 감염 동안에 분비 과정의 타이밍을 필요로 한다. 이 시점에서 모든 분비된 Esx 단백질이 독소로 작용하거나 발병에 간접적으로 기여하는 지는 불명확하다.
- [0133] 포도상구균은 면역 방어로부터 피하기 위한 전략으로서 숙주 세포에 표면 단백질 매개된-부착 또는 조직의 침투에 의지한다. 게다가, 에스. 아우레우스는 감염 동안에 표면 단백질을 이용하여 숙주로부터 철을 격리한다. 스태필로코커스 발병에 연관된 표면 단백질의 대부분은 C-말단 분류 신호를 보유한다. 즉, 이들은 소르타제에 의해 세포벽 외막에 공유적으로 연결된다. 또한, 표면 단백질 고정을 위해 필요한 유전자 (즉, 소르타제 A 및 B)가 결핍된 스태필로코커스 균주는 수 가지 다른 마우스 질병 모델에서 현저한 병독성 결함을 나타낸다. 따라서, 표면 단백질 항원은 상응하는 유전자가 스태필로코커스 질병의 발생에 필수적임에 따라 명백한 백신 표적을 대표하며 본 발명의 여러 가지 양태에서 이용될 수 있다. 소르타제 효소 상위계열은 펩티도글리칸 세포벽 층에 표면 단백질 병독성 인자를 고정시켜 주는 역할을 하는 그람 양성 트랜스펩티다제이다. 두 가지 소르타제 이소형 SrtA 및 SrtB가 스태필로코커스 아우레우스에서 확인되었다. 이들 효소는 기질 단백질내 LPXTG 모티프를 인식하는 것으로 제시되었다. SrtB 이소형은 헵 철 획득 및 철 항상성에서 중요한 것으로 보이는 반면 SrtA 이소형은 세포벽 펩티도글리칸에 어드헤신 및 기타 단백질의 공유적 고정을 통해 숙주 조직에 세균이 부착하는 능력을 조절함으로써 그람 양성 세균의 발병에 중요한 역할을 한다. 특정 양태로서 본원에 기술된 SpA 변이체는 Coa, Eap, Ebh, Emp, EsaC, EsaB, EsxA, EsxB, Hla, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, IsdC, SasF, vWbp 및/또는 vWh 단백질과 같은 다른 스태필로코커스 단백질과 배합하여 사용할 수 있다.
- [0134] 본 발명의 특정 관점은 폴리펩타이드, 펩타이드 또는 SpA 변이체를 암호화한 핵산 및 다른 스태필로코커스 항원 (예: Ess 경로에 의해 수송된 다른 단백질) 또는 소르타제 기질을 포함한 단백질성 조성물에 관한 방법 및 조성물을 포함한다. 이러한 단백질은 결실, 삽입 및/또는 치환에 의해 변형될 수 있다.
- [0135] Esx 폴리펩타이드는 스태필로코커스 속의 세균으로부터의 Esx 단백질의 아미노산 서열을 포함한다. Esx 서열은 스태필로코커스 아우레우스와 같은 특정 스태필로코커스 종으로부터 유래할 수 있고 뉴만과 같은 특정 균주로부터 유래할 수 있다. 특정 양태에서, EsxA 서열은 균주 Mu50으로부터의 SAV0282 (뉴만과 동일한 아미노산 서열임)이고 Genbank 등록번호 Q99WU4 (gi | 68565539)(본원에 참조로 인용됨)를 사용하여 입수할 수 있다. 다른 양태로서, EsxB 서열은 균주 Mu50으로부터의 SAV0290 (뉴만과 동일한 아미노산 서열임)이고 Genbank 등록번호 Q99WT7 (gi | 68565532)(본원에 참조로 인용됨)를 사용하여 입수할 수 있다. 추가의 양태로서, Ess 경로에 의해 이송된 다른 폴리펩타이드가 사용될 수 있으며, 그들의 서열은 본 분야의 숙련가가 데이터베이스 및 인터넷에서 입수가능한 자원을 사용하여 확인할 수 있다.
- [0136] 소르타제 기질 폴리펩타이드는 이들로 한정되는 것은 아니지만 스태필로코커스 속의 균주로부터의 SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, IsdC 또는 SasF 단백질의 아미노산 서열을 포함한다. 소르타제 기질 폴리펩타이드 서열은 스태필로코커스 아우레우스와 같은 특정 스태필로코커스 종으로부터 유래할 수 있고 뉴만과 같은 특정 균주로부터 유래할 수 있다. 특정 양태로서, SdrD 서열은 균주 N315로부터 유래된 것이며 Genbank 등록번호

호 NP_373773.1 (gi | 15926240)(본원에 참조로 인용된다)를 사용하여 입수할 수 있다. 다른 양태로서, SdrE 서열은 균주 N315로부터 유래된 것이며 Genbank 등록번호 NP_373774.1 (gi | 15926241)(본원에 참조로 인용된다)를 사용하여 입수할 수 있다. 다른 양태로 IsdA 서열은 균주 Mu50으로부터 유래된 SAV1130 (뉴만의 아미노산 서열과 동일함)이며 Genbank 등록번호 NP_371654.1 (gi | 15924120)(본원에 참조로 인용된다)을 사용하여 입수할 수 있다. 다른 양태로서, IsdB 서열은 균주 Mu50으로부터 유래된 SAV1129 (뉴만의 아미노산 서열과 동일함)이며 Genbank 등록번호 NP_371653.1 (gi | 15924119)(본원에 참조로 인용된다)을 사용하여 입수할 수 있다. 추가의 양태로서, Ess 경로에 의해 수송된 또는 소르타제에 의해 프로세싱된 다른 폴리펩타이드가 사용될 수 있으며, 이의 서열은 본 분야의 숙련가가 데이터베이스 및 인터넷에서 입수가 가능한 자원을 사용하여 확인할 수 있다.

[0137] 본 발명의 맥락에서 사용될 수 있는 여러 가지 단백질의 예는 이들로 한정되는 것은 아니지만 등록번호 NC_002951 (GI:57650036 및 GenBank CP000046), NC_002758 (GI:57634611 및 GenBank BA000017), NC_002745 (GI:29165615 및 GenBank BA000018), NC_003923 (GI:21281729 및 GenBank BA000023), NC_002952 (GI:49482253 및 GenBank BX571856), NC_002953 (GI:49484912 및 GenBank BX571857), NC_007793 (GI:87125858 및 GenBank CP000255), NC_007795 (GI:87201381 및 GenBank CP000253) (각각은 본원에 참조로 인용된다)를 포함하여 세균 계통의 데이터베이스 입력치를 분석하여 확인할 수 있다.

[0138] 본원에 사용된 "단백질" 또는 "폴리펩타이드"는 10개 이상의 아미노산 잔기를 포함한 분자를 가리킨다. 그러나, 일부 양태에서, 단백질 또는 폴리펩타이드의 야생형이 본 발명의 많은 양태에서 사용되며, 변형된 단백질 또는 폴리펩타이드가 면역 반응을 생성하기 위해 사용된다. 상기된 용어는 상호교환하여 사용할 수 있다. "변형된 단백질" 또는 "변형된 폴리펩타이드" 또는 "변이체"는 야생형 단백질 또는 폴리펩타이드에서 화학 구조, 특히 아미노산 서열이 변이된 단백질 또는 폴리펩타이드를 가리킨다. 일부 양태에서, 변형된/변이 단백질 또는 폴리펩타이드는 적어도 하나의 변형된 활성 또는 기능을 갖는다 (단백질 또는 폴리펩타이드는 다수의 활성 또는 기능을 가질 수 있음을 인지함). 특히 고려되는 것은 변형된/변이 단백질 또는 폴리펩타이드가 한 가지 활성 또는 기능에서 변이될 수 있으면서 면역원성과 같은 다른 측면에서 야생형 활성 또는 기능을 유지하는 것이다.

[0139] 특정 양태에서 단백질 또는 폴리펩타이드 (야생형 또는 변형된)의 크기는 이들로 한정되는 것은 아니지만 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, 2500개의 아미노 분자 또는 그 이상 및 이 안에서 과생가능한 모든 범위 또는 본원에 기술된 또는 참조로 인용된 상응하는 아미노 서열의 유도체를 포함할 수 있다. 폴리펩타이드는 절두에 의해 변이되어 상응하는 야생형보다 짧아질 수 있지만 특정 기능을 갖는 (예: 표적 또는 편재를 위해, 면역원성의 증가를 위해, 정제 목적을 위해 등) 이중 단백질과 융합 또는 결합시켜 변이될 수 있음이 고려된다.

[0140] 본원에 사용된 "아미노 분자"는 본 분야에 알려진 모든 아미노산, 아미노산 유도체 또는 아미노산 모사체를 가리킨다. 특정 양태에서, 단백질 분자의 잔기는 어떠한 비-아미노 분자도 아미노 분자 잔기의 서열을 차단하지 않고 순차적이다. 다른 양태에서, 서열은 하나 이상의 비-아미노 분자 잔기를 포함할 수 있다. 특정 양태에서, 단백질 분자의 잔기의 서열은 하나 이상의 비-아미노 분자 잔기에 의해 차단될 수 있다.

[0141] 따라서, 용어 "단백질성 조성물"은 천연적으로 합성된 단백질의 20개 공통 아미노산 중 하나 이상 또는 변형된 또는 특이한 아미노산 하나 이상을 포함한 아미노 분자 서열을 포함한다.

[0142] 단백질성 조성물은 (i) 표분 분자 생물 기술을 통한 단백질, 폴리펩타이드 또는 펩타이드의 발현, (ii) 천연원으로부터 단백질 화합물의 분리 또는 (iii) 단백질 물질의 화학 합성을 포함하여 본 분야의 숙련가에게 알려진 기술 어떠한 것에 의해서도 제조될 수 있다. 여러 유전자에 대한 뉴클레오타이드뿐만 아니라 단백질, 폴리펩타이드 및 펩타이드 서열은 이미 공지되어 있으며 공인된 컴퓨터 데이터베이스에서 찾아 볼 수 있다. 한 가지 그러한 데이터베이스는 National Center for Biotechnology Information의 Genbank 및 GenPept 데이터베이스 (www.ncbi.nlm.nih.gov)이다. 이들 유전자의 암호화 영역은 본원에 기술된 기술을 이용하여 또는 본 분야에 통

상의 지식을 가진 자에 알려져 있는 바에 따라 증폭 및 또는 발현할 수 있다.

- [0143] 본 발명에 따른 SpA, 코아글라제 및 다른 폴리펩타이드의 아미노산 서열 변이체는 치환, 삽입 또는 결실 변이체 일 수 있다. 본 발명에 따른 폴리펩타이드의 변이는 아생형과 비교하여 그 폴리펩타이드의 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, 50개 또는 그 이상의 비-연속 또는 연속 아미노산에 영향을 미칠 수 있다. 변이체는 본원에 제공된 또는 참조로 인용된 서열 (예: 서열번호 2-8 또는 서열번호 11-30)과 적어도 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% (이들 사이의 모든 수치 및 범위를 포함함) 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 변이체는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 어떠한 스타필로코커스 종 및 균주로부터 유래된 Ess 경로 또는 다른 표면 단백질 (표 1 참조)에 의해 프로세싱된 또는 분비된 폴리펩타이드 또는 소르타제 기질이 본원에 기술된 조성물 및 방법에 사용되는 것으로 고려된다.
- [0144] 결실 변이체는 전형적으로 천연 또는 아생형 단백질에서 하나 이상의 잔기가 결실된 것이다. 개개의 잔기가 결실될 수 있거나 다수의 인접한 아미노산이 결실될 수 있다. 종결 코돈이 (치환 또는 삽입에 의해) 암호화 핵산 서열내로 도입되어 절두된 단백질을 생성할 수 있다. 삽입 돌연변이체는 전형적으로 폴리펩타이드의 비-말단부에 물질의 부가를 포함한다. 이것은 하나 이상의 잔기의 삽입을 포함할 수 있다. 융합 단백질이라고 하는 말단 부가가 또한 생성될 수 있다. 이들 융합 단백질은 본원에 기술된 또는 참조로 인용된 하나 이상의 펩타이드 또는 폴리펩타이드의 다량체 또는 연쇄체를 포함한다.
- [0145] 치환 변이체는 전형적으로 단백질내 하나 이상의 부위에서 1개 아미노산이 다른 것으로 교체된 것을 포함하며 그 폴리펩타이드의 특성 한 가지 이상이 다른 기능 또는 특성이 상실되면서 또는 상실되지 않으면서 조절되도록 설계될 수 있다. 치환은 보존적일 수 있다. 즉, 한 개 아미노산이 유사한 모양 및 전하를 갖는 아미노산으로 치환된다. 보존 치환은 본 분야에 잘 알려져 있으며, 예를 들면 알라닌이 세린으로; 아르기닌이 리신으로; 아스파라긴이 글루타민 또는 히스티딘으로; 아스파르테이트가 글루타메이트로; 시스테인이 세린으로; 글루타민이 아스파라긴으로; 글루타메이트가 아스파르테이트로; 글리신이 프롤린으로; 히스티딘이 아스파라긴 또는 글루타민으로; 이소류신이 류신 또는 발린으로; 류신이 발린 또는 이소류신으로; 리신이 아르기닌으로; 메티오닌이 류신 또는 이소류신으로; 페닐알라닌이 티로신, 류신 또는 메티오닌으로; 세린이 트레오닌으로; 트레오닌이 세린으로; 트립토판이 티로신으로; 티로신이 트립토판 또는 페닐알라닌으로; 및 발린이 이소류신 또는 류신으로 변화되는 것을 포함한다. 다른 방안으로서, 치환은 폴리펩타이드의 기능 또는 활성이 영향을 받도록 비보존적일 수 있다. 비보존적 변화는 전형적으로 잔기가 화학적으로 유사하지 않은 것으로, 예를 들어 극성 또는 전하된 아미노산이 비극성 또는 비전하된 아미노산으로 또는 반대로 치환되는 것을 포함한다.

표 1

에스. 아우레우스 균주의 표면 단백질 예

SAV #	SA#	표면	MW2	Mu50	N315	뉴만	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
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

[0146]

[0147]

본 발명의 단백질은 시험관내에서 재조합 또는 합성될 수 있다. 다른 방안으로서, 비재조합 또는 재조합 단백질을 세균으로부터 분리할 수 있다. 또한, 그러한 변이체를 함유한 세균을 본 발명의 조성물 및 방법에 이용할 수 있음이 고려된다. 결과적으로, 단백질은 분리할 필요가 없다.

[0148]

본원에서 용어 "기능적으로 동등한 코돈"은 아르기닌 또는 세린을 위한 6개 코돈과 같은 동일한 아미노산을 암호화한 코돈을 가리키며, 또한 생물학적으로 동등한 아미노산을 암호화한 코돈을 가리킨다 (아래 표 2 참조).

표 2

코돈 표

아미노산	코돈
알라닌 Ala	A GCA GCC GCG GCU
시스테인 Cys	C UGC UGU
아스파르트산 Asp	D GAC GAU
글루탐산 Glu	E GAA GAG
페닐알라닌 Phe	F UUC UUU
글리신 Gly	G GGA GGC GGG GGU
히스티딘 His	H CAC CAU
이소류신 Ile	I AUA AUC AUU
리신 Lys	K AAA AAG
류신 Leu	L UUA UUG CUA CUC CUG CUU
메티오닌 Met	M AUG
아스파라긴 Asn	N AAC AAU
프롤린 Pro	P CCA CCC CCG CCU
글루타민 Gln	Q CAA CAG
아르기닌 Arg	R AGA AGG CGA CGC CGG CGU
세린 Ser	S AGC AGU UCA UCC UCG UCU
트레오닌 Thr	T ACA ACC ACG ACU
발린 Val	V GUA GUC GUG GUU
트립토판 Trp	W UGG
티로신 Tyr	Y UAC UAU

[0149]

[0150]

또한, 아미노산 및 핵산 서열은 추가의 잔기, 예를 들어 추가의 N- 또는 C-말단 아미노산 또는 각각 5' 또는 3' 서열을 포함할 수 있으나, 반드시 본원에 기술된 서열 중 하나를 위해 설명한 바와 같고 그 서열이 단백질 발현

이 관련된 생물학적 단백질 활성 (예: 면역원성)의 유지를 포함한 상기 설명된 기준을 충족해야 한다. 특히 말단 서열의 부가는 예를 들어 암호화 영역의 5' 또는 3' 부분 어느 한쪽의 여러 가지 비-암호화 서열 플랜킹을 포함할 수 있는 핵산 서열에 적용한다.

[0151] 아래 설명은 변이 폴리펩타이드 또는 펩타이드를 생성하기 위해 단백질의 아미노산을 변화시킨 것을 기초로 한 내용이다. 예를 들면, 특정 아미노산은 항체의 항원-결합 영역 또는 기질 분자 상의 결합 부위와 같은 구조에서 상호작용 결합능이 측정가능한 정도로 상실되거나 되지 않으면서 단백질 구조내의 다른 아미노산을 위해 치환될 수 있다. 단백질의 작용 활성을 정의하는 것은 그 단백질의 상호작용능 및 성질이기에 때문에 특정 아미노산 치환은 단백질 서열내 및 이의 DNA 암호화 서열에서 이루어질 수 있으면서 그럼에도 불구하고 목적하는 특성을 갖는 단백질을 생성한다. 따라서, 본 발명자들은 유전자의 DNA 서열에서 다양한 변화가 이루어질 수 있음을 고려한다.

[0152] 본 발명의 조성물에 mL 당 약 0.001 mg 내지 약 10 mg의 전체 폴리펩타이드, 펩타이드 및/또는 단백질이 함유되는 것이 고려된다. 조성물 중 단백질의 농도는 약, 적어도 약 또는 많아야 약 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, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0 mg/mL 또는 그 이상 (또는 이들 수치 사이의 모든 범위)일 수 있다. 이 가운데 약, 적어도 약 또는 많아야 약 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, 100%는 SpA 변이체 또는 코아글라제일 수 있으며, 다른 펩타이드 또는 폴리펩타이드 (예: 다른 세균 펩타이드 및/또는 항원)와 배합하여 사용할 수 있다.

[0153] 본 발명은 스타필로코커스 병원체에 의한 감염과 연관된 질환 또는 증세의 발생에 대해 예방 또는 치료 효과를 얻기 위해 변이 SpA 폴리펩타이드 또는 펩타이드를 투여하는 것을 포함한다.

[0154] 특정 관점에서, 스타필로코커스 항원의 배합이 스타필로코커스 감염의 치료 또는 예방에 효과적인 면역원성 조성물의 생성에 사용된다. 스타필로코커스 감염은 수 가지 다른 단계로 진행된다. 예를 들어, 스타필로코커스 생활사는 공생하는 집락형성, 인접한 조직 또는 혈류에 접근함으로써의 감염 개시 및/또는 혈액에서의 혐기성 증식을 포함한다. 에스. 아우레우스 병독성 결정소와 숙주 방어 기전사이의 상호 작용은 심내막염, 전이성농양 형성 및 패혈 증후군과 같은 합병증을 유도할 수 있다. 세균의 표면에 있는 다른 분자들은 감염 주기의 다른 단계에 연관되어 있다. 특정 항원의 배합은 스타필로코커스 감염의 복수 단계에 대해 예방하는 면역 반응을 유도할 수 있다. 면역 반응의 효과는 동물 모델 검정 및/또는 오피소닌식세포 검정을 사용하여 측정할 수 있다.

[0155] D. 폴리펩타이드 및 폴리펩타이드 생성

[0156] 본 발명은 이의 여러 양태에 사용하기 위한 폴리펩타이드, 펩타이드 및 단백질 및 이의 면역원성 단편을 기술한다. 예를 들면, 특이적 폴리펩타이드는 면역 반응에 대해 검정되거나 면역 반응을 유도하기 위해 사용된다. 특정 양태에서, 본 발명에 따른 단백질의 전부 또는 일부가 또한 종래 기술에 따라 용액 중에서 또는 고체 지지체상에서 합성될 수 있다. 여러 가지 자동 합성장치가 시판되고 있으며 공지된 프로토콜에 따라 사용할 수 있다 (참조예: Stewart and Young, (1984); Tam et al., (1983); Merrifield, (1986); 및 Barany and Merrifield (1979), 이들 각 문헌은 본원에 참조로 인용된다).

[0157] 다른 방안으로서, 발현 벡터내로 본 발명의 펩타이드를 암호화한 뉴클레오타이드 서열을 삽입하고 적당한 숙주 세포내로 형질전환 또는 형질감염시키며 발현에 적합한 조건하에서 배양하는 재조합 DNA 기술을 사용할 수 있다.

[0158] 본 발명의 한 가지 양태는 폴리펩타이드 또는 펩타이드의 생성 및/또는 제공을 위해 미생물을 포함한 세포로의 유전자 전달의 이용을 포함한다. 해당 폴리펩타이드 또는 펩타이드에 대한 유전자는 적절한 숙주 세포내로 전달될 수 있고 이어서 적당한 조건하에서 세포의 배양이 이루어질 수 있다. 재조합 발현 벡터 및 본원에 포함된 요소들의 생성은 본 분야에 잘 알려져 있으며 본원에 개략적으로 논의되어 있다. 다른 방안으로서, 생성하고자 하는 단백질은 세포에 의해 정상적으로 합성되어 분리되고 정제된 내인성 단백질일 수 있다.

[0159] 본 발명의 다른 양태는 면역원 생성물, 보다 특정적으로는 면역원 활성을 갖는 단백질을 발현하는 바이러스 벡터로 형질감염된 자가 B 림프구 세포주를 사용한다. 포유동물 숙주 세포주의 다른 예는 이들로 한정되는 것은 아니지만 Vero 및 HeLa 세포, 다른 B- 및 T-세포주 (예: CEM, 721.221, H9, Jurkat, Raji)뿐만 아니라 차이니

즈 햄스터 난소 세포주, W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK의 세포주를 포함한다. 또한, 삽입된 서열의 발현을 조절하거나 유전자 생성물을 원하는 방식으로 변형하고 프로세싱하는 숙주 세포주를 선택할 수 있다. 단백질 산물의 그러한 변형 (예: 글리코실화) 및 프로세싱 (예: 절단)은 단백질의 기능에 중요할 수 있다. 다른 숙주 세포는 단백질의 해독-후 프로세싱 및 변형을 위한 특징적이고 특이적인 기전을 갖는다. 발현된 외래 단백질의 정확한 변형 및 프로세싱을 보장하기에 적절한 세포주 또는 숙주 시스템을 선택할 수 있다.

[0160] 많은 선별 시스템이 사용될 수 있으며, 이들로 한정되는 것은 아니지만 tk-세포내 HSV 티미딘 키나제, hgprt-세포내 하이포크산틴-구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제 또는 aprt-세포내 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라제 유전자를 포함한다. 또한, 항-대사물질 내성이 선별 기준으로서 이용될 수 있다: 트리메토프림 및 메토포렉세이트에 대한 내성을 제공하는 dhfr; 마이코페놀산에 대한 내성을 제공하는 gpt; 아미노글리코사이드 G418에 대한 내성을 제공하는 neo; 및 하이그로마이신에 대한 내성을 제공하는 hygro.

[0161] 동물 세포는 시험관내에서 두 가지 방식으로 증식할 수 있다: 배양물의 벌크 도처의 현탁액 중에서 성장하는 비-고정-의존 세포로서 또는 증식을 위해 고체 기질로의 부착이 필요한 고정-의존 세포로서 (즉, 세포 성장의 단층 유형).

[0162] 연속으로 설정된 세포주로부터의 비-고정 의존 또는 현탁액 배양물이 세포 및 세포 생성물의 대량 생산을 위해 가장 널리 사용되는 수단이다. 그러나, 현탁액 배양된 세포는 종양발생 잠복성 및 고착 세포보다 낮은 단백질 생성과 같은 한계를 갖고 있다.

[0163] 단백질이 본원에서 특징적으로 언급되는 경우, 천연 또는 재조합 단백질 또는 임의로 모든 신호 서열이 제거된 단백질을 참조하는 것이 바람직하다. 단백질은 스태필로코커스 균주로부터 직접 분리될 수 있거나 재조합 DNA 기술에 의해 생성될 수 있다. 단백질의 면역원성 단편은 본 발명에 따른 면역원성 조성물내로 혼입될 수 있다. 이들은 적어도 단백질의 아미노산 서열로부터 유래된 인접한 10개의 아미노산, 20개의 아미노산, 30개의 아미노산, 40개의 아미노산, 50개의 아미노산 또는 100개의 아미노산 (이들 사이의 모든 개수 및 범위를 포함함)을 포함한 단편이다. 또한, 이러한 면역원성 단편은 스태필로코커스 단백질에 대해 발생된 항체 또는 포유동물 숙주가 포도상구균으로 감염되어 발생한 항체와 면역학적으로 반응한다. 또한, 면역원성 단편은 유효 용량으로 투여되었을 때 (단독으로 또는 담체에 결합된 합텐으로서) 스태필로코커스 감염에 대해 예방 또는 치료 면역 반응을 나타내는 단편을 포함한다. 특정 관점에서는 에스. 아우레우스 및/또는 에스. 에피더미디스 감염에 대해 예방적이다. 이러한 면역원성 단편은 예를 들면 N-말단 리더 서열 및/또는 막관통 도메인 및/또는 C-말단 앵커 도메인이 결합된 단백질을 포함할 수 있다. 바람직한 관점에서, 본 발명의 면역원성 단편은 본원에 기술된 또는 참고로 인용된 폴리펩타이드의 분절 서열과 적어도 80% 동일성, 적어도 85% 동일성, 적어도 90% 동일성, 적어도 95% 동일성 또는 적어도 97-99% 동일성 (이들 사이의 모든 수치 및 범위를 포함함)을 갖는 단백질의 세포 외 도메인의 실질적으로 모든 것을 포함한다.

[0164] 또한, 본 발명의 면역원성 조성물은 한 가지 이상의 스태필로코커스 단백질로 구성된 융합 단백질 또는 스태필로코커스 단백질의 면역원성 단편을 포함한다. 이러한 융합 단백질은 재조합적으로 제작할 수 있으며 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 스태필로코커스 단백질 또는 분절 중 한 가지 일부를 포함할 수 있다. 다른 방안으로서, 융합 단백질은 적어도 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 스태필로코커스 단백질의 부분을 복수로 포함할 수 있다. 이들은 상이한 스태필로코커스 단백질 및/또는 복수의 동일한 단백질 또는 단백질 단편 또는 동일한 단백질내의 면역원성 단편을 조합할 수 있다 (다량체 또는 연쇄체를 형성함). 다른 방안으로서, 본 발명은 또한 T-세포 에피토프 또는 정제 태그의 제공자 (예: β-갈락토시다제, 글루타티온-S-트랜스퍼라제, 녹색 형광 단백질 (GFP), 에피토프 태그 (예: FLAG, myc 태그, 폴리 히스티딘) 또는 바이러스 표면 단백질 (예: 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌) 또는 세균 단백질 (예: 과산화물 독소이드, 디프테리아 독소이드 또는 CRM197))와 같은 이종 서열과의 융합 단백질로서 스태필로코커스 단백질 또는 이의 면역원성 단편들의 개별적인 융합 단백질을 포함한다.

[0165] IV. 핵산

[0166] 특정 양태로서, 본 발명은 본 발명의 단백질, 폴리펩타이드, 펩타이드를 암호화한 재조합 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이다. SpA, 코아글라제 및 다른 세균 단백질에 대한 핵산 서열이 포함되며 이들 모두는 본원에 참고로 인용되고 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 제조하기 위해 사용될 수 있다.

[0167] 본원에 사용된 용어 "폴리뉴클레오타이드"는 재조합되거나 전체 게놈 핵산으로부터 유리되어 분리된 핵산 분자를 가리킨다. 용어 "폴리뉴클레오타이드"는 올리고뉴클레오타이드 (길이가 100개 미만의 잔기인 핵산) 또는 예

를 들어 플라스미드, 코스미드, 파지, 바이러스 등을 포함한 재조합 벡터를 포함한다. 특정 관점에서 폴리뉴클레오타이드는 이의 천연 유전자 또는 단백질 암호화 서열로부터 실질적으로 분리된 조절 서열을 포함한다. 폴리뉴클레오타이드는 일본쇄 (암호화 또는 안티센스) 또는 이본쇄일 수 있으며 RNA, DNA (게놈성, cDNA 또는 합성), 이의 유사체 또는 이의 조합일 수 있다. 추가의 암호화 또는 비-암호화 서열이 반드시 필요한 것은 아니지만 폴리뉴클레오타이드내에 존재할 수 있다.

[0168] 이와 관련하여 용어 "유전자" 또는 "폴리뉴클레오타이드" 또는 "핵산"은 단백질, 폴리펩타이드 또는 펩타이드 (적당한 전사, 해독 후 변형 또는 편제에 필요한 모든 서열을 포함함)를 암호화하는 핵산을 가리키기 위해 사용된다. 본 분야의 숙련가는 이해할 수 있는 것처럼 이 용어는 단백질, 폴리펩타이드, 도메인, 펩타이드, 융합 단백질 및 돌연변이체를 발현하거나 발현하도록 개조될 수 있는 게놈 서열, 발현 카세트, cDNA 서열 및 좀 더 작게 제작된 핵산 분절을 포함한다. 폴리펩타이드의 전부 또는 일부를 암호화한 핵산은 본원에 기술된 또는 참고로 인용된 아미노산 서열 하나 이상을 암호화한 폴리뉴클레오타이드의 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, 1100, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 9000, 10000개 또는 그 이상의 뉴클레오타이드, 뉴클레오사이드 또는 염기쌍 (이들 사이의 모든 숫자 및 범위를 포함함)의 연속 핵산 서열을 함유할 수 있다. 또한, 특정 폴리펩타이드는 약간 상이한 핵산 서열을 갖는 변이를 함유하나 동일하거나 실질적으로 유사한 단백질을 암호화한 핵산에 의해 암호화될 수 있음이 고려된다 (상기 표 2 참조).

[0169] 특정 양태로서, 본 발명은 변이 SpA 또는 코아굴라제를 암호화한 핵산 서열을 포함한 분리된 핵산 분절 및 재조합 벡터에 관한 것이다. 용어 "재조합"은 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드와 병용될 수 있으며, 일반적으로 시험관내에서 생성 및/또는 조작된 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 또는 이러한 분자의 복제 산물인 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드를 가리킨다.

[0170] 다른 양태로서, 본 발명은 피검체에게 면역 반응을 발생하는 변이 SpA 또는 코아굴라제 폴리펩타이드 또는 펩타이드를 암호화한 핵산 서열을 포함한 분리된 핵산 분절 및 재조합 벡터에 관한 것이다. 여러 가지 양태로서, 본 발명의 핵산은 유전자 백신으로 사용될 수 있다.

[0171] 본 발명에 사용된 핵산 분절은 프로모터, 폴리아데닐화 신호, 추가의 제한 효소 부위, 복수의 클로닝 부위, 다른 암호화 분절 등과 같은 다른 핵산 서열과 조합될 수 있으며, 이에 따라 핵산 분절의 전체 길이는 상당히 다양할 수 있다. 따라서, 어떠한 길이의 핵산 단편도 사용될 수 있음이 고려되며, 바람직하게는 총 길이가 의도한 재조합 핵산 프로토콜에서 제조 및 사용의 편의성에 의해 한정된다. 일부 경우에서, 핵산 서열은 예를 들어 폴리펩타이드의 정제, 이송, 분비, 해독-후 변형을 허용하거나 표적 또는 효능과 같은 치료상 이점을 제공하는 추가의 이중 암호화 서열을 갖는 폴리펩타이드 서열을 암호화할 수 있다. 상기된 바와 같이 태그 또는 다른 이중 폴리펩타이드는 변형된 폴리펩타이드-암호화 서열에 부가될 수 있으며, 여기서 "이중"은 변형된 폴리펩타이드와 동일하지 않은 폴리펩타이드를 가리킨다.

[0172] 특정 다른 양태에서, 본 발명은 서열번호 1 (SpA 도메인 D) 또는 서열번호 3 (SpA) 또는 코아굴라제 또는 다른 분비된 병원성 인자 및/또는 Ess 경로에 의해 수송되고 소르타제에 의해 프로세싱된 단백질 또는 본원에 참고로 인용된 단백질을 포함한 표면 단백질을 암호화한 모든 다른 핵산 서열을 내포하는 분리된 핵산 단편 및 재조합 벡터에 관한 것이다.

[0173] 특정 양태로서, 본 발명은 본원에 기술된 서열과 실질적인 상동성을 갖는 폴리뉴클레오타이드 변이체, 즉 본원에 사용된 방법 (예: 표준 변수를 이용한 BLAST 분석)을 사용하여 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 서열과 비교하여 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 또는 그 이상의 서열 상동성을 포함한 것을 제공한다.

[0174] 본 발명은 또한 상기된 모든 폴리뉴클레오타이드와 상보적인 폴리뉴클레오타이드의 사용을 포함한다.

[0175] E. 벡터

- [0176] 본 발명의 폴리펩타이드는 벡터에 내포된 핵산 분자에 의해 암호화될 수 있다. 용어 "벡터"는 이중 핵산 서열이 복제되고 발현될 수 있는 세포내로의 도입을 위해 삽입될 수 있는 담체 핵산 분자를 가리킨다. 핵산 서열은 "이중"일 수 있으며, 이 용어는 핵산 서열이 포함된 벡터가 도입되는 세포 또는 핵산 서열이 포함된 핵산에 외래성임을 의미하며, 세포 또는 핵산내 서열과 상동성이지만 핵산 서열이 보통 발견되지 않는 세포 또는 핵산내의 위치에 있는 서열을 포함한다. 벡터는 DNA, RNA, 플라스미드, 코스미드, 바이러스 (박테리오파지, 동물 바이러스 및 식물 바이러스) 및 인공 염색체 (예: YAC)를 포함한다. 본 분야의 숙련가는 표준 재조합 기술을 통해 벡터를 제작할 준비가 충분히 되어 있다 (예: Sambrook et al., 2001; Ausubel et al., 1996, 이들 문헌의 내용은 본원에 참고로 인용된다). 변이 SpA 폴리펩타이드를 암호화하는 것 이외에 벡터는 한 가지 이상의 다른 세균 펩타이드, 태그 또는 면역원성 증강 펩타이드와 같은 다른 폴리펩타이드 서열을 암호화할 수 있다. 이러한 융합 단백질을 암호화하는 유용한 벡터는 pIN 벡터 (Inouye et al., 1985), 일직선의 히스티딘을 암호화하는 벡터 및 후반 정제 및 분리 또는 절단을 위한 글루타티온 S-트랜스퍼라제 (GST) 가용성 융합 단백질을 생성하는데 사용하기 위한 pGEX 벡터를 포함한다.
- [0177] 용어 "발현 벡터"는 전사될 수 있는 유전자 생성물의 적어도 일부를 암호화하는 핵산 서열을 함유한 벡터를 가리킨다. 일부 경우에 있어서, RNA 분자는 단백질, 폴리펩타이드 또는 펩타이드로 해독된다. 발현 벡터는 특정 숙주 유기체에서 작동적으로 연결된 암호화 서열의 전사 및 가능하게는 해독을 위해 필요한 핵산 서열을 가리키는 다양한 "조절 서열"을 함유할 수 있다. 전사 및 해독을 통제하는 조절 서열이외에, 벡터 및 발현 벡터는 다른 기능을 또한 수행하고 본원에 기술된 핵산 서열을 함유할 수 있다.
- [0178] 1. 프로모터 및 인핸서
- [0179] "프로모터"는 조절 서열이다. 프로모터는 전형적으로 전사의 개시 및 속도를 조절하는 핵산 서열의 영역이다. 프로모터는 RNA 폴리머라제 및 다른 전사 인자와 같은 조절 단백질 및 분자가 결합할 수 있는 유전자 요소를 함유할 수 있다. 문구 "작동적으로 위치한", "작동적으로 연결된", "조절하에" 및 "전사 조절하에"는 프로모터가 핵산 서열의 전사 개시 및 발현을 조절하기 위해 그 핵산 서열과 관련하여 정확한 기능상 위치 및/또는 방향에 있음을 의미한다. 프로모터는 핵산 서열의 전사 활성화에 연관된 cis-작용성 조절 서열을 가리키는 "인핸서"와 병용될 수 있거나 그렇지 않을 수 있다.
- [0180] 당연히 발현을 위해 선택된 세포 유형 또는 유기체에서 DNA 분절의 발현을 효과적으로 유도하는 프로모터 및/또는 인핸서를 사용하는 것은 중요할 수 있다. 분자 생물학 분야의 숙련가는 일반적으로 단백질 발현을 위한 프로모터, 인핸서 및 세포 유형의 조합적 사용을 알고 있다 (Sambrook et al., 2001 참조, 이의 내용은 본원에 참고로 인용된다). 사용된 프로모터는 지속성, 조직-특이성 또는 유도성일 수 있고, 특정 양태에서 재조합 단백질 또는 펩타이드의 대량 생산과 같은 특화된 조건하에서 도입된 DNA 분절의 고 수준 발현을 유도할 수 있다.
- [0181] 여러 가지 요소/프로모터가 유전자의 발현을 조절하기 위해 본 발명의 맥락에서 사용될 수 있다. 특정 자극에 반응하여 활성화될 수 있는 핵산 서열의 영역인 그러한 유도성 요소의 예는 이들로 한정되는 것은 아니지만 면역글로불린 중쇄 (Banerji et al., 1983; Gilles et al., 1983; Grosschedl et al., 1985; Atchinson et al., 1986, 1987; Imler et al., 1987; Weinberger et al., 1984; Kiledjian et al., 1988; Porton et al., 1990), 면역글로불린 경쇄 (Queen et al., 1983; Picard et al., 1984), T 세포 수용체 (Luria et al., 1987; Winoto et al., 1989; Redondo et al., 1990), HLA DQ α 및/또는 DQ β (Sullivan et al., 1987), β 인터페론 (Goodbourn et al., 1986; Fujita et al., 1987; Goodbourn et al., 1988), 인터루킨-2 (Greene et al., 1989), 인터루킨-2 수용체 (Greene et al., 1989; Lin et al., 1990), MHC 클래스 II 5 (Koch et al., 1989), MHC 클래스 II HLA-DR α (Sherman et al., 1989), β -액틴 (Kawamoto et al., 1989; Ng et al., 1989), 근육 크레아틴 키나제 (MCK) (Jaynes et al., 1988; Horlick et al., 1989; Johnson et al., 1989), 전알부민 (트랜스타이레틴) (Costa et al., 1988), 엘라스타제 I (Ornitz et al., 1987), 메탈로티오네인 (MTII) (Karin et al., 1987; Culotta et al., 1989), 콜라게나제 (Pinkert et al., 1987; Angel et al., 1987), 알부민 (Pinkert et al., 1987; Tronche et al., 1989, 1990), α -태아단백질 (Godbout et al., 1988; Campere et al., 1989), γ -글로빈 (Bodine et al., 1987; Perez-Stable et al., 1990), β -글로빈 (Trudel et al., 1987), c-fos (Cohen et al., 1987), c-Ha-Ras (Triesman, 1986; Deschamps et al., 1985), 인슐린 (Edlund et al., 1985), 신경세포 부착 분자 (NCAM) (Hirsh et al., 1990), α 1-안티트리페인 (Latimer et al., 1990), H2B (TH2B) 히스톤 (Hwang et al., 1990), 마우스 및/또는 I형 콜라젠 (Ripe et al., 1989), 글루코즈-조절된 단백질 (GRP94 and GRP78) (Chang et al., 1989), 쥐 성장 호르몬 (Larsen et al., 1986), 사람 혈청 아밀로이드 A (SAA) (Edbrooke et al., 1989), 트로포닌 I (TN I) (Yutzey et al., 1989), 혈소판-파생된 성장 인자 (PDGF) (Pech et al., 1989), Duchenne Muscular Dystrophy (Klamut et al., 1990), SV40 (Banerji et al.,

1981; Moreau *et al.*, 1981; Sleigh *et al.*, 1985; Firak *et al.*, 1986; Herr *et al.*, 1986; Imbra *et al.*, 1986; Kadesch *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 1986; Ondek *et al.*, 1987; Kuhl *et al.*, 1987; Schaffner *et al.*, 1988), 폴리오마 (Swartzendruber *et al.*, 1975; Vasseur *et al.*, 1980; Katinka *et al.*, 1980, 1981; Tyndell *et al.*, 1981; Dandolo *et al.*, 1983; de Villiers *et al.*, 1984; Hen *et al.*, 1986; Satake *et al.*, 1988; Campbell *et al.*, 1988), 레트로바이러스 (Kriegler *et al.*, 1982, 1983; Levinson *et al.*, 1982; Kriegler *et al.*, 1983, 1984a, b, 1988; Bosze *et al.*, 1986; Miksicek *et al.*, 1986; Celander *et al.*, 1987; Thiesen *et al.*, 1988; Celander *et al.*, 1988; Choi *et al.*, 1988; Reisman *et al.*, 1989), 유두종 바이러스 (Campo *et al.*, 1983; Lusky *et al.*, 1983; Spandidos and Wilkie, 1983; Spalholz *et al.*, 1985; Lusky *et al.*, 1986; Cripe *et al.*, 1987; Gloss *et al.*, 1987; Hirochika *et al.*, 1987; Stephens *et al.*, 1987), B형 간염 바이러스 (Bulla *et al.*, 1986; Jameel *et al.*, 1986; Shaul *et al.*, 1987; Spandau *et al.*, 1988; Vannice *et al.*, 1988), 사람 면역결핍 바이러스 (Muesing *et al.*, 1987; Hauber *et al.*, 1988; Jakobovits *et al.*, 1988; Feng *et al.*, 1988; Takebe *et al.*, 1988; Rosen *et al.*, 1988; Berkhout *et al.*, 1989; Laspia *et al.*, 1989; Sharp *et al.*, 1989; Braddock *et al.*, 1989), 사이토메갈로 바이러스 (CMV) IE (Weber *et al.*, 1984; Boshart *et al.*, 1985; Foecking *et al.*, 1986), 긴팔원숭이 백혈병 바이러스 (Holbrook *et al.*, 1987; Quinn *et al.*, 1989)를 포함한다.

[0182] 유도성 요소는 이들로 한정되는 것은 아니지만 MT II - 포볼 에스테르 (TFA)/중금속 (Palmiter *et al.*, 1982; Haslinger *et al.*, 1985; Searle *et al.*, 1985; Stuart *et al.*, 1985; Imagawa *et al.*, 1987, Karin *et al.*, 1987; Angel *et al.*, 1987b; McNeill *et al.*, 1989); MMTV (마우스 유선 종양 바이러스) - 글루코코르티코이드 (Huang *et al.*, 1981; Lee *et al.*, 1981; Majors *et al.*, 1983; Chandler *et al.*, 1983; Lee *et al.*, 1984; Ponta *et al.*, 1985; Sakai *et al.*, 1988); β -인터페론-폴리(rI)x/폴리(rc) (Tavernier *et al.*, 1983); 아데노바이러스 5 E2 - E1A (Imperiale *et al.*, 1984); 콜라게나제 - 포볼 에스테르 (TPA) (Angel *et al.*, 1987a); 스트로멜리신 - 포볼 에스테르 (TPA) (Angel *et al.*, 1987b); SV40 - 포볼 에스테르 (TPA) (Angel *et al.*, 1987b); 쥐 MX 유전자 - 인터페론, 뉴캐슬 병 바이러스 (Hug *et al.*, 1988); GRP78 유전자 - A23187 (Resendez *et al.*, 1988); α -2-마크로글로불린 - IL-6 (Kunz *et al.*, 1989); 비멘틴 - 혈청 (Rittling *et al.*, 1989); MHC 클래스 I 유전자 H-2kb - 인터페론 (Blonar *et al.*, 1989); HSP70 - E1A/SV40 대형 T 항원 (Taylor *et al.*, 1989, 1990a, 1990b); 프롤리페린 - 포볼 에스테르/TPA (Mordacq *et al.*, 1989); 종양 괴사 인자 - PMA (Hensel *et al.*, 1989); 및 갑상선 자극 호르몬 α 유전자 - 갑상선 호르몬 (Chatterjee *et al.*, 1989)을 포함한다.

[0183] 본 발명의 폴리펩타이드를 암호화하는 펩타이드 또는 단백질의 발현을 조절하기 위해 사용되는 특정 프로모터는 이 프로모터가 표적 세포, 바람직하게는 세균 세포에서 그 폴리펩타이드를 발현할 수 있는 한 중요한 것은 아니다. 사람 세포가 표적인 경우, 폴리펩타이드 암호화 영역은 사람 세포에서 발현될 수 있는 프로모터에 인접하여 및 프로모터의 조절하에 위치시키는 것이 바람직하다. 일반적으로, 그러한 프로모터는 세균, 사람 또는 바이러스 프로모터를 포함할 수 있다.

[0184] 단백질의 발현을 위해 피검체에게 벡터를 투여하는 양태에서, 벡터와 사용하기에 바람직한 프로모터는 사이토카인에 의해 하향 조절되지 않는 프로모터 또는 비록 하향 조절되지만 면역 반응을 유발하기에 유효한 양의 변이 SpA를 생성하기에 충분히 강력한 프로모터임이 고려된다. 이들 프로모터의 비제한적 예는 CMV IE 및

[0185] RSV LTR이다. 특히 항원의 발현이 바람직한 세포 (예: 수지상 세포 또는 대식세포)에서 발현이 이루어지는 경우 조직 특이적 프로모터가 사용될 수 있다. 포유동물 MHC I 및 MHC II 프로모터는 그러한 조직-특이적 프로모터의 예이다.

[0186] 2. 개시 신호 및 내부 리보솜 결합 부위 (IRES)

[0187] 또한 특이적 개시 신호가 암호화 서열의 효율적인 해독을 위해 필요할 수 있다. 이들 신호는 ATG 개시 코돈 또는 인접한 서열을 포함한다. ATG 개시 코돈을 포함한 외래성 해독 조절 서열이 제공될 필요가 있을 수 있다. 본 분야에 보통의 기술을 가진 자는 이것을 용이하게 결정하고 필요한 신호를 제공할 수 있다.

[0188] 본 발명의 특정 양태에서, 내부 리보솜 진입 부위 (IRES) 요소가 멀티유전자 또는 폴리시스트론 정보를 형성하기 위해 사용된다. IRES 요소는 5' 메틸화 Cap 의존 해독의 리보솜 스캐닝 모델을 우회하고 해독을 내부 부위에서 시작할 수 있다 (Pelletier and Sonenber, 1988; Macejak and Sarnow, 1991). IRES 요소는 이중 개방 판독 프레임에 연결될 수 있다. 다수의 개방 판독 프레임은 함께 전사될 수 있으며, 각각은 폴리시스트론 정보를 형성하는 IRES에 의해 분리되어 있다. 다수의 유전자는 단일 프로모터/인핸서를 사용하여 효율적으로 발현되어

단일 정보를 전사할 수 있다 (미국특허 제5,925,565호 및 제5,935,819호 참조, 이들 내용은 본원에 참고로 인용된다).

[0189] 3. 선택 및 선별 마커

[0190] 본 발명의 특정 양태에서, 발현 벡터내에 선별 또는 선택 마커를 암호화함으로써 본 발명의 핵산 작제물을 함유한 세포를 시험관내 또는 생체내에서 확인할 수 있다. 전사 및 해독될 때 마커는 세포에 확인가능한 변화를 제공하여 발현 벡터를 함유한 세포의 간편한 확인을 허용한다. 일반적으로, 선택 마커는 선택을 허용하는 특성을 제공하는 것이다. 양성 선택 마커는 마커의 존재가 그의 선택을 허용하는 것인 한편, 음성 선택 마커는 이의 존재가 이의 선택을 억제하는 것이다. 양성 선택 마커의 예는 약물 내성 마커이다.

[0191] F. 숙주 세포

[0192] 본원에 사용된 용어 "세포", "세포주" 및 "세포 배양물"은 상호교환적으로 사용될 수 있다. 이들 용어 모두는 또한 모든 차세대인 자손을 포함한다. 모든 자손은 의도적인 또는 우연한 돌연변이로 인해 동일하지 않을 수 있음은 이해된다. 이중 핵산 서열의 발현이라는 맥락에서, "숙주 세포"는 원핵 또는 진핵 세포를 가리키며, 벡터를 복제할 수 있거나 벡터에 의해 암호화된 이중 유전자를 발현할 수 있는 어떠한 형질가능한 유기체도 포함한다. 숙주 세포는 벡터 또는 바이러스를 위한 수용체로서 사용될 수 있거나 사용되어 왔다. 숙주 세포는 "형질감염" 또는 "형질전환"될 수 있으며, 이 용어는 재조합 단백질-암호화 서열과 같은 외래성 핵산이 숙주 세포 내로 전달되거나 도입되는 과정을 가리킨다. 형질전환된 세포는 1차 해당 세포 및 이의 자손을 포함한다.

[0193] 숙주 세포는 벡터의 복제 또는 핵산 서열의 일부 또는 전부의 발현을 위한 세균, 효모 세포, 곤충 세포 및 포유동물 세포를 포함한 원핵세포 또는 진핵세포로부터 유래될 수 있다. 많은 세포주 및 배양물이 숙주 세포로 이용 가능하며 이들은 생존 배양물 및 유전 물질의 저장소로 역할을 하는 기관인 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(ATCC)(www.atcc.org)를 통해 입수할 수 있다.

[0194] G. 발현 시스템

[0195] 상기 논의된 조성물의 적어도 일부 또는 전부를 포함한 많은 발현 시스템이 존재한다. 원핵세포- 및/또는 진핵세포-기반 시스템이 본 발명과 사용되어 핵산 서열 또는 이들의 동족 폴리펩타이드, 단백질 및 펩타이드를 생성할 수 있다. 그러한 많은 숙주 시스템들은 시판되고 있고 널리 이용되고 있다.

[0196] 곤충 세포/배칼로바이러스 시스템은 예를 들어 미국특허 제5,871,986호, 제4,879,236호 (이들 내용은 본원에 참고로 인용된다)에 기술되어 있는 이중 핵산 분절의 고 수준의 단백질 발현을 생성할 수 있다. 이들 시스템은 예를 들어 INVITROGEN®으로부터 품명 MAXBAC® 2.0으로 및 CLONTECH®으로부터 품명 BACPACK™ BACULOVIRUS EXPRESSION SYSTEM으로 구입할 수 있다.

[0197] 본 발명의 기술된 발현 시스템이외에, 발현 시스템의 다른 예는 합성 엑디손-유도성 수용체를 포함한 STRATAGENE®의 COMPLETE CONTROL™ 유도성 포유동물 발현 시스템 또는 이의 pET 발현 시스템 (이. 콜라이 발현 시스템)을 포함한다. 이용되고 있는 유도성 발현 시스템의 다른 예는 INVITROGEN®의 T-REX™ (테트라사이클린-조절된 발현) 시스템으로 이는 전체 길이의 CMV 프로모터를 이용하는 유도성 포유동물 발현 시스템이다. 또한 INVITROGEN®은 피키아 메타놀리카(*Pichia methanolica*) 발현 시스템으로 불리는 효모 발현 시스템을 제공하며, 이는 메틸영양성 효모 피키아 메타놀리카에서 재조합 단백질을 고 수준으로 생성하기 위해 설계된 것이다. 본 분야 숙련가는 핵산 서열 또는 이의 동족 폴리펩타이드, 단백질 또는 펩타이드를 생성하기 위해 발현 작제물과 같은 벡터를 어떻게 발현시켜야 하는지를 알고 있다.

[0198] V. 폴리사카라이드

[0199] 본 발명의 면역원성 조성물은 또한 PIA (또한 PNAG로도 알려짐) 및/또는 에스. 아우레우스 V형 및/또는 VIII형 협막 폴리사카라이드 및/또는 에스. 에피티미디스 I형 및/또는 II형 및/또는 III형 협막 폴리사카라이드를 포함한 협막 폴리사카라이드를 포함할 수 있다.

- [0200] H. PIA (PNAG)
- [0201] PS/A, PIA 및 SAA로 확인된 스타필로코커스 표면 폴리사카라이드의 여러 형태가 동일한 화학 물질 - PNAG임은 분명하다 (Maira-Litran et al., 2004). 따라서, 용어 PIA 또는 PNAG는 모든 이들 폴리사카라이드 또는 이들로부터 파생된 올리고사카라이드를 포함한다.
- [0202] PIA는 폴리사카라이드 세포간 어드헤신이며 N-아세틸 및 O-석시닐 성분으로 치환된 β -(1→6)-연결된 글루코사민의 중합체로 구성된다. 이 폴리사카라이드는 에스. 아우레우스 및 에스. 에피데미디스 모두에서 존재하며 어느 쪽 세균으로부터도 분리할 수 있다 (Joyce et al., 2003; Maira-Litran et al., 2002). 예를 들면, PNAG는 에스. 아우레우스 MN8m (W004/43407)로부터 분리할 수 있다. 에스. 에피데미디스로부터 분리된 PIA는 생물막의 필수 성분이다. 이는 세포-세포 어드헤신을 매개하는 역할을 하며 아마도 또한 성장하는 군체를 숙주의 면역 반응으로부터 차단하는 기능을 한다. 이전에 폴리-N-석시닐- β -(1→6)-글루코사민 (PNSG)로 알려진 폴리사카라이드 PIA는 N-석시닐화의 확인이 부정확해서 예상된 구조를 갖지 않는 것으로 최근에 제시되었다. (Maira-Litran et al., 2002). 따라서, 공식적으로는 PNSG로 알려져 있고 지금은 PNAG로 밝혀진 그 폴리사카라이드 또한 용어 PIA로서 포괄된다.
- [0203] PIA (또는 PNAG)는 (N-아세틸 및 O-석시닐 성분으로 치환된 β -(1→6)-연결된 글루코사민)의 30개 이하의 반복 단위로 구성된, 400kDa 이상, 75 내지 400kDa, 10 내지 75kDa의 크기가 다양한 올리고사카라이드일 수 있다. 어떠한 크기의 PIA 폴리사카라이드 또는 올리고사카라이드도 본 발명의 면역원성 조성물에 사용될 수 있으며, 한 가지 관점에서 그 폴리사카라이드는 40kDa 이상이다. 크기측정은 본 분야에 공지된 방법, 예를 들어 미세유동화, 초음파 방사 또는 화학적 절단 (W003/53462, EP497524, EP497525)에 의해 달성될 수 있다. 특정 관점에서 PIA (PNAG)는 적어도 또는 많아야 40-400kDa, 40-300kDa, 50-350kDa, 60-300kDa, 50-250kDa 및 60-200kDa이다.
- [0204] PIA (PNAG)는 아미노 그룹상에서의 아세테이트에 의한 치환으로 인해 아세틸화 정도가 다를 수 있다. 시험관내에서 생성된 PIA는 아미노 그룹상에서 거의 전체적으로 치환되어 있다 (95-100%). 다른 방도로서, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% 미만의 아세틸화를 갖는 탈아세틸화된 PIA (PNAG)가 사용될 수 있다. PNAG의 비-아세틸화된 에피토프가 그람 양성 세균, 바람직하게는 에스. 아우레우스 및/또는 에스. 에피데미디스의 흡소닌 사멸을 매개하는데 효율적이기 때문에 탈아세틸화된 PIA (PNAG)를 사용하는 것이 바람직하다. 특정 관점에서, PIA (PNAG)는 40kDa 내지 300kDa의 크기를 가지며 60%, 50%, 40%, 30% 또는 20% 미만의 아미노 그룹이 아세틸화되도록 탈아세틸화된다.
- [0205] 용어 탈아세틸화된 PNAG (dPNAG)는 아미노 그룹의 60%, 50%, 40%, 30%, 20% 또는 10% 미만이 아세틸화된 PNAG 폴리사카라이드 또는 올리고사카라이드를 가리킨다. 특정 관점에서, PNAG를 천연 폴리사카라이드로 화학적으로 처리함으로써 탈아세틸화하여 dPNAG를 형성한다. 예를 들면, 천연 PNAG를 0.1-5 M, 0.2-4 M, 0.3-3 M, 0.5-2 M, 0.75-1.5 M 또는 1 M NaOH, KOH 또는 NH₄OH를 처리한다. 처리는 20-100, 25-80, 30-60 또는 30-50 또는 35-45°C의 온도에서 적어도 20 내지 30분, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 10시간, 15시간 또는 20시간 동안 진행된다. dPNAG는 W004/43405에 기술된 바와 같이 제조할 수 있다.
- [0206] 폴리사카라이드는 담체 단백질에 접합 또는 비접합될 수 있다.
- [0207] I. 에스. 아우레우스로부터 유래된 5형 및 8형 폴리사카라이드
- [0208] 남성에게 감염을 일으키는 에스. 아우레우스의 대다수 균주는 5형 또는 8형 폴리사카라이드를 함유한다. 사람 균주의 약 60%는 8형이고 약 30%는 5형이다. 5형 및 8형 헤파 폴리사카라이드 항원의 구조는 Moreau et al., (1990) 및 Fournier et al., (1984)에 기술되어 있다. 둘 다 이들의 반복 단위에서 FucNAcp를 갖고 있을 뿐만 아니라 설프하이드릴 그룹을 도입하는데 사용될 수 있는 ManNAcA를 갖는다. 이 구조는 다음과 같다:
- [0209] 5형
- [0210] →4)- β -D-ManNAcA(3OAc)-(1→4)- α -L-FucNAc(1→3)- β -D-FucNAc-(1→
- [0211] 8형

- [0212] →3)-β-D-ManNAcA(40Ac)-(1→3)-α-L-FucNAc(1→3)-β-D-FucNAc-(1→
- [0213] 최근에 (Jones, 2005) NMR 분광법으로 구조가 다음과 같이 수정되었다:
- [0214] 5형
- [0215] →4)-β-D-ManNAcA-(1→4)-α-L-FucNAc(30Ac)(1→3)-β-D-FucNAc-(1→
- [0216] 8형
- [0217] →3)-β-D-ManNAcA(40Ac)-(1→3)-α-L-FucNAc(1→3)-β-D-FucNAc-(1→
- [0218] 폴리사카라이드는 본 분야의 숙련자에게 잘 알려진 방법을 사용하여 에스. 아우레우스의 적절한 균주로 부터 추출할 수 있다 (미국특허 제6,294,177호 참조). 예를 들어 ATCC 12902는 5형 에스. 아우레우스 균주이고 ATCC 12605는 8형 에스. 아우레우스 균주이다.
- [0219] 폴리사카라이드는 천연 그대로의 크기이거나 다르게는 예를 들어 미세유동화, 초음파 방사 또는 화학적 처리에 의해 크기축정될 수 있다. 또한, 본 발명은 에스. 아우레우스의 5형 및 8형 폴리사카라이드로부터 파생된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 본 발명의 면역원성 조성물에 포함된 5형 및 8형 폴리사카라이드는 바람직하게는 아래에 기술된 바와 같이 담체 단백질에 접합되거나 다르게는 비접합된다. 본 발명의 조성물은 다른 방안으로서 5형 또는 8형 폴리사카라이드 중 하나를 함유한다.
- [0220] J. 에스. 아우레우스 336 항원
- [0221] 한 양태로서, 본 발명의 면역원성 조성물은 미국특허 제6,294,177호에 기술된 에스. 아우레우스 336 항원을 포함한다. 336 항원은 β-연결된 헥소사민을 포함하고, 0-아세틸 그룹을 함유하지 않으며 ATCC 55804로 기탁된 에스. 아우레우스 336형에 대한 항체와 특이적으로 결합한다. 한 양태로서, 336 항원은 천연 그대로의 크기이거나 다르게는 예를 들어 미세유동화, 초음파 방사 또는 화학적 처리에 의해 크기축정될 수 있는 폴리사카라이드이다. 또한, 본 발명은 336 항원으로부터 유래된 올리고사카라이드를 포함한다. 336 항원은 비접합되거나 담체 단백질에 접합될 수 있다.
- [0222] K. 에스. 에피더미디스로부터의 I형, II형 및 III형 폴리사카라이드
- [0223] 백신접종에서 폴리사카라이드의 사용과 연관된 문제들 가운데는 폴리사카라이드 자체가 불량한 면역원이라는 사실이다. 본 발명에 사용되는 폴리사카라이드는 면역원성을 향상시키기 위해 외래 T-세포 보조를 제공하는 단백질 담체에 연결하는 것이 바람직하다. 폴리사카라이드 면역원에 결합될 수 있는 담체의 예는 디프테리아 및 파상풍 독소이드 (각각, DT, DT CRM197 및 TT), 열쇠 구멍 샷갓 조개 헤모시아닌 (KLH) 및 투버쿨린의 정제된 단백질 유도체 (PPD), 슈도모나스 아에루기노사 엑소단백질 A (rEPA), 해모필루스 인플루엔자로부터의 단백질 D, 뉴몰리신 또는 상기된 것의 단편을 포함한다. 사용하기에 적합한 단편은 T-헬퍼 에피토프를 함유한 단편을 포함한다. 특히 에이치. 인플루엔자로부터의 단백질 D 단편은 바람직하게는 그 단백질의 N-말단 1/3을 함유한다. 단백질 D는 해모필루스 인플루엔자로부터의 IgD-결합 단백질이며 (EP 0 594 610 B1) 잠재적 면역원이다. 또한, 스타필로코커스 단백질은 본 발명의 폴리사카라이드 결합체에서 담체 단백질로 사용될 수 있다.
- [0224] 스타필로코커스 백신의 맥락에서 사용하기에 특히 유리한 담체 단백질은 스타필로코커스 알파 독소이드이다. 접합 과정이 독성을 감소시키기 때문에 천연 형태가 폴리사카라이드에 접합될 수 있다. 바람직하게는 His35Leu 또는 His35Arg와 같은 유전적으로 탈독소화된 알파 독소가 잔여 독성이 보다 낮기 때문에 담체로 사용된다. 다른 방안으로서, 알파 독소는 가교제, 포름알데하이드 또는 글루타르알데하이드로 처리하여 화학적으로 탈독소화된다. 유전적으로 탈독소화된 알파 독소는 임의로 화학적으로 탈독소화되며, 바람직하게는 추가로 독성을 감소시키기 위해 가교제, 포름알데하이드 또는 글루타르알데하이드로 처리하여 탈독소화한다.
- [0225] 폴리사카라이드는 어떠한 공지 방법 (예를 들어 미국특허 제4,372,945호, 제4,474,757호 및 제4,356,170호에 기술된 방법)에 의해서도 담체 단백질에 연결될 수 있다. 바람직하게는, CDAP 접합 화학반응을 실시한다

(W095/08348 참조). CDAP에서, 폴리사카라이드-단백질 접합체의 합성을 위해 시아닐화제 1-시아노-디메틸아미노피리디늄 테트라플루오로보레이트 (CDAP)를 사용하는 것이 바람직하다. 시아닐화 반응은 알카리 민감성 폴리사카라이드의 가수분해를 피하는 비교적 온화한 조건하에서 실시될 수 있다. 이러한 합성은 담체 단백질과의 직접적인 결합을 허용한다.

[0226] 접합은 바람직하게는 담체 단백질과 폴리사카라이드 사이의 직접적인 연결을 생성을 하는 것을 포함한다. 임의로 담체 단백질과 폴리사카라이드 사이에 스페이서 (예: 아디프산 이수화물 (ADH))가 도입될 수 있다.

[0227] IV. 면역 반응 및 검정

[0228] 상기된 바와 같이 본 발명은 변이 SpA 또는 코아글라제 펩타이드에 대해 피검체에서 면역 반응을 유도하는 것에 관한 것이다. 한 가지 양태로서, 면역 반응은 감염 또는 관련된 질환, 특히 포도상구균과 연관된 것을 갖고 있거나, 갖고 있는 것으로 의심되거나, 발생 위험이 있는 피검체를 예방 또는 치료할 수 있다. 본 발명에 따른 면역원성 조성물의 한 가지 용도는 감염의 위험이 높은 병원 또는 기타 환경에서 절차를 밟기 전에 피검체에게 접종함으로써 병원내 감염을 예방하는데 있다.

[0229] A. 면역검정

[0230] 본 발명은 면역 반응이 본 발명의 조성물에 의해 유도되거나 발생되는지의 여부 및 어느 정도인지를 평가하기 위한 혈청학적 검정의 실시를 포함한다. 실시할 수 있는 면역검정은 많은 유형이 있다. 본 발명에 속하는 면역검정은 이들로 한정되는 것은 아니지만 미국특허 제4,367,110호에 기술된 것 (이중 모노클로날 항체 샌드위치 검정) 및 미국특허 제4,452,901호에 기술된 것 (웨스턴 블롯)을 포함한다. 다른 검정법은 시험관내 및 생체내의 표지된 리간드의 면역침강 및 면역세포화학을 포함한다.

[0231] 면역검정은 일반적으로 결합 검정이다. 특정한 바람직한 면역검정은 본 분야에 알려진 여러 유형의 효소 연결된 면역흡착 검정 (ELISA) 및 방사선면역검정 (RIA)이다. 조직 박편을 이용하는 면역조직화학 검출이 또한 유용하다. 한 가지 예로서, 항체 또는 항원이 폴리스티렌 미세구가 플레이트내 웰, 시험지 또는 컬럼 지지체와 같은 선택된 표면에 고정된다. 그런 다음 임상 시료와 같은 목적 항원 또는 항체를 함유하는 것으로 의심되는 시험 조성물을 웰에 첨가한다. 결합시키고 세척하여 비특이적으로 결합된 면역 복합체를 제거한 후, 결합된 항원 또는 항체를 검출할 수 있다. 검출은 일반적으로 검출용 표지에 연결되는 목적 항원 또는 항체에 특이적인 다른 항체의 첨가에 의해 달성된다. ELISA의 이러한 유형이 "샌드위치 ELISA"로 알려져 있다. 또한 검출은 목적 항원에 특이적인 이차 항체의 첨가에 이어서 이차 항체에 대해 결합 친화성을 갖는 삼차 항체의 첨가에 의해 삼차 항체가 검출용 표지에 결합됨으로써 달성될 수 있다.

[0232] 경쟁 ELISA는 또한 피검 시료가 표지된 항원 또는 항체의 알려진 양과 결합하는 것에 경쟁하는 가능한 구현이다. 미지의 시료중에 반응 물질의 양은 피복된 웰과 배양하기 전에 또는 동안에 그 시료를 알려진 표지된 물질과 혼합시켜 결정한다. 시료중의 반응 물질의 존재는 웰에 결합하는데 이용되는 표지된 물질의 양을 감소시키는 작용을 하며, 그럼으로써 최종 신호를 감소시킨다. 사용된 포맷과 무관하게, ELISA는 공통된 특징을 갖고 있으며, 예로서 피복, 배양 또는 결합, 비특이적으로 결합된 물질을 제거하기 위한 세척 및 결합된 면역 복합체의 검출을 들 수 있다.

[0233] 또한, 항원 또는 항체는 예를 들면 플레이트, 비드, 시험지, 막 또는 컬럼 매트릭스의 형태인 고체 지지체에 연결될 수 있으며, 분석될 시료는 고정된 항원 또는 항체에 적용된다. 플레이트를 항원 또는 항체로 피복함에 있어서, 일반적으로는 플레이트의 웰을 항원 또는 항체의 용액과 밤새 또는 특정 기간 동안 배양한다. 그런 다음 플레이트의 웰을 세척하여 불안정하게 흡착된 물질을 제거한다. 이어서, 웰에 남아 있는 이용가능한 표면을 피검 항원량의 관점에서 항원적으로 중성인 비특이적 단백질로 피복한다. 이들 단백질은 소혈청 알부민 (BSA), 카세인 및 분유의 용액을 포함한다. 피복은 고정화하는 표면에 비특이적 흡착 부위의 차단을 허용하며, 이에 따라 표면에 항원량의 비특이적 결합에 의해 발생된 배경을 감소시켜 준다.

[0234] B. 세균 감염의 진단

[0235] 상기된 바와 같이 감염을 치료하거나 예방하기 위하여 단백질, 폴리펩타이드 및/또는 펩타이드 뿐만 아니라 이들 폴리펩타이드, 단백질 및/또는 펩타이드와 결합하는 항체를 사용하는 것 이외에, 본 발명은 감염될 수 있는 환자 또는 의료기의 위치에 따라 감염의 진단을 위해 포도상구균의 존재를 검출하는 것을 포함한 여러 가지 방법으로 이들 폴리펩타이드, 단백질, 펩타이드 및/또는 항체를 사용하는 것을 포함한다. 본 발명에 따르면, 감

염의 존재를 검출하는 바람직한 방법은 한 가지 이상의 스태필로코커스 세균 중 또는 균주에 의해 감염된 것으로 의심되는 시료, 예를 들면 피검체의 혈액, 타액, 조직, 골, 근육, 연골 또는 피부로부터 채취한 시료를 수득하는 단계를 포함한다. 시료를 분리한 후 본 발명의 폴리펩타이드, 단백질, 펩타이드 및/또는 항체를 사용하여 진단 검정을 실시하여 포도상구균의 존재를 검출할 수 있으며, 시료중의 그러한 존재를 결정하는 검정 기술은 본 분야의 숙련가에게 잘 알려져 있고 방사선면역검정, 웨스턴 블롯 분석 및 ELISA 검정을 포함한다. 일반적으로, 본 발명에 따르면, 포도상구균으로 감염된 것으로 의심되는 시료를 본 발명에 따른 폴리펩타이드, 단백질, 펩타이드, 항체 또는 모노클로날 항체에 첨가하고 폴리펩타이드, 단백질 및/또는 펩타이드에 결합하는 항체 또는 시료중에서 항체에 결합하는 폴리펩타이드, 단백질 및/또는 펩타이드에 의해 포도상구균을 표시하여 감염을 진단하는 방법이 고려된다.

[0236] 따라서, 본 발명에 따른 항체는 스태필로코커스 세균으로부터의 감염 예방 (즉, 수동 면역화)을 위해, 진행중인 감염의 치료를 위해 또는 연구용 도구로서 사용될 수 있다. 본원에 사용된 용어 "항체"는 모노클로날, 폴리클로날, 키메릭, 단일쇄, 이중특이성, 유인원화된 및 사람화된 또는 영장류화된 항체 뿐만 아니라 Fab 면역글로불린 발현 라이브러리의 산물을 포함한 Fab 단편 (예: 항체의 결합 특이성을 유지하는 단편)을 포함한다. 따라서, 본 발명은 항체의 가변 중쇄 및 경쇄와 같은 단일쇄의 사용을 고려한다. 이러한 유형의 항체 또는 항체 단편들의 생성은 본 분야의 숙련가에게 잘 알려져 있다. 세균 단백질에 대한 항체의 생성에 관한 특정 실시예는 미국특허 공보 제20030153022호에서 찾아 볼 수 있다. 이 특허의 내용 전체는 본원에 참고로 인용된다.

[0237] 상기된 폴리펩타이드, 단백질, 펩타이드 및/또는 항체 어떠한 것도 스태필로코커스 세균의 확인 및 정량을 위해 검출용 표지로 직접 표지될 수 있다. 면역검정에 사용하는 표지는 일반적으로 본 분야의 숙련가에게 알려져 있으며 효소, 방사선동위원소 및 형광물질, 발광물질 및 발색물질 (금콜로이드 또는 라텍스 비드와 같은 착색 입자를 포함함)을 포함한다. 적합한 면역검정은 효소-연결된 면역흡착 검정 (ELISA)를 포함한다.

[0238] C. 보호 면역

[0239] 본 발명의 일부 양태로서, 단백질 조성물은 피검체에게 보호 면역을 제공한다. 보호 면역는 면역 반응이 작용하는 균과 연관된 특정 질병 또는 증세가 그 면역 반응이 존재하는 피검체에게 발생하는 것으로부터 예방 특이적 면역 반응을 증가시키는 몸체의 능력을 가리킨다. 면역학적으로 유효한 양은 피검체에게 보호 면역을 제공할 수 있다.

[0240] 본원의 명세서 및 특허청구범위에 사용된 용어 폴리펩타이드 또는 펩타이드는 아미노산이 펩타이드 결합을 통해 공유적으로 연결되어 있는 쇠를 가리킨다. 다른 폴리펩타이드는 본 발명에 따른 다른 작용기를 갖는다. 한 가지 관점에서 폴리펩타이드는 수용자에게 능동 면역 반응을 유도하도록 설계된 면역원으로부터 유래되는 한편, 본 발명의 다른 관점에 따르면, 폴리펩타이드는 예를 들어 동물에게 능동 면역 반응의 발생을 제공하고 수용자에게 수동 면역 반응을 유도하는 역할을 할 수 있는 항체로부터 유래된다. 그러나, 양쪽 모두 폴리펩타이드는 모든 가능한 코돈 용법에 따른 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화된다.

[0241] 본원에 사용된 용어 "면역 반응" 또는 이와 동일한 용어 "면역학적 반응"은 접종 환자에서 본발명의 단백질, 펩타이드, 탄수화물 또는 폴리펩타이드에 대한 체액성 (항체 매개된) 반응, 세포성 (항원-특이적 T 세포 또는 이의 분비 산물에 의해 매개된) 반응 또는 체액성과 세포성 모두의 반응의 발생을 가리킨다. 이러한 반응은 면역원의 투여에 의해 유도된 능동 반응 또는 항체, 항체-함유 물질 또는 초회항원자극 T-세포의 투여에 의해 유도된 수동 반응일 수 있다. 세포성 면역 반응은 클래스 I 또는 클래스 II MHC 분자와 관련하여 폴리펩타이드에 피토프의 제시에 의해 유도되어 항원-특이적 CD4 (+) T 헬퍼 세포 및/또는 CD8 (+) 세포독성 T 세포를 활성화한다. 이 반응은 또한 단핵구, 대식세포, NK 세포, 호염구, 수지상세포, 성상세포, 소교세포, 호산구 또는 선천 면역의 다른 성분과 연관이 있을 수 있다. 본원에 사용된 "능동 면역"은 항원의 투여에 의해 피검체에게 부여된 모든 면역성을 가리킨다.

[0242] 본원에 사용된 "수동 면역"은 피검체에게 항원을 투여하지 않고서 피검체에게 부여된 모든 면역성을 가리킨다. 따라서, "수동 면역"은 이들로 한정되는 것은 아니지만 면역 반응의 세포성 매개체 또는 단백질 매개체 (예: 모노클로날 및/또는 폴리클로날 항체)를 포함한 활성화된 면역 주효세포의 투여를 포함한다. 모노클로날 또는 폴리클로날 항체 조성물은 항체에 의해 인지된 항원을 갖는 유기체에 의한 감염의 예방 또는 치료를 위한 수동 면역화에 사용될 수 있다. 항체 조성물은 다양한 유기체와 연관될 수 있는 여러 가지 항원과 결합하는 항체를 포함할 수 있다. 항체 성분은 폴리클로날 항혈청일 수 있다. 특정 관점에서 항체 또는 항체들은 항원으로 시험 감염된 동물 또는 이차 피검체로부터 친화성 정제된다. 다른 방안으로서, 이들로 한정되는 것은 아니지만 스태필로코커스 세균을 포함한 그람-음성 세균, 그람-양성 세균과 같은 동일한, 관련된 또는 상이한 미생물 또는 유

기체에 존재하는 항원에 대한 모노클로날 및/또는 폴리클로날 항체의 혼합물인 항체 혼합물이 사용될 수 있다.

- [0243] 수동 면역은 알려진 면역반응성을 갖는 공여자 또는 다른 비-환자 공급자로부터 수득된 면역글로불린 (Ig) 및/또는 다른 다른 면역 인자를 환자에 투여하여 환자 또는 피검체에게 부여할 수 있다. 다른 관점에서, 본 발명의 항원성 조성물은 스타필로코커스 또는 다른 유기체에 대한 항체를 함유한 항원성 조성물로의 시험감염에 반응하여 생성된 글로불린 ("과다면역 글로불린")의 공급자 또는 공여자로서 작용하는 피검체에게 투여될 수 있다. 그렇게 처리된 피검체는 혈장을 공여하여 이로부터 통상적인 혈장-분획법을 통해 과다면역 글로불린을 얻고 다른 피검체에게 투여하여 스타필로코커스 감염에 대한 내성을 부여하거나 치료한다. 본 발명에 따른 과다면역 글로불린은 특히 면역-약화된 개체, 감염 과정을 겪고 있는 개체 또는 백신접종에 반응하여 자신의 항체를 생성할 수 있는 시간을 갖지 못하는 개체에 유용하다. 수동 면역과 연관된 방법 및 조성물의 예로서 미국특허 제6,936,258호, 제6,770,278호, 제6,756,361호, 제5,548,066호, 제5,512,282호, 제4,338,298호 및 제4,748,018호를 참조할 수 있으며 이들 특허의 전체 내용은 본원에 참고로 인용된다.
- [0244] 본원 명세서 및 특허청구범위의 목적을 위해 용어 "에피토프" 및 "항원 결정소"는 B 및/또는 T 세포가 반응하거나 인지하는 항원상의 부위를 가리키기 위해 상호교환적으로 사용된다. B-세포 에피토프는 단백질의 3차원 폴딩에 의해 병치된 연속 아미노산 또는 비연속 아미노산 모두로부터 생성될 수 있다. 연속 아미노산으로부터 형성된 에피토프는 변성 용매에 노출되었을 때 전형적으로 유지되는 반면, 3차원 폴딩에 의해 형성된 에피토프는 변성 용매로 처리된 경우 전형적으로 상실된다. 에피토프는 전형적으로 독특한 공간 형태에서 적어도 3개, 보통은 적어도 5개 또는 8-10개의 아미노산을 포함한다. 에피토프의 공간 형태를 결정하는 방법은 예를 들어 X-선 결정학 및 2차원 핵자기공명을 포함한다 (참조예: Epitope Mapping Protocols (1996)). 동일한 에피토프를 인지하는 항체는 한 항체가 표적 항원에 다른 항체 항체의 결합을 차단하는 능력을 보여주는 간단한 면역검정으로 확인할 수 있다. T-세포는 CD8 세포의 경우 약 9개 아미노산 또는 CD4 세포의 경우 약 13-15개 아미노산의 연속 에피토프를 인지한다. 에피토프를 인지하는 T 세포는 에피토프에 반응하여 초회항원자극 T-세포에 의한³H-티미딘 혼입에 의해 (Burke et al., 1994), 항원-의존 사멸에 의해 (세포독성 T 림프구 검정, Tigges et al., 1996) 또는 사이토카인 분비에 의해 결정되는 바와 같이 항원-의존 증식을 측정하는 시험관내 검정으로 확인할 수 있다.
- [0245] 세포-매개된 면역학적 반응의 존재는 증식 검정 (CD4 (+) T 세포) 또는 CTL (세포독성 T 림프구) 검정에 의해 결정될 수 있다. 면역원의 예방 또는 치료 효과에 대한 체액성 및 세포성 반응의 상대적 기여는 면역화된 동물 유전자 동물로부터 IgG 및 T-세포를 별도로 분리하고 이차 피검체에서의 예방 또는 치료 효과를 측정함으로써 구분할 수 있다.
- [0246] 본원 명세서 및 특허청구범위에 사용된 용어 "항체" 또는 "면역글로불린"은 상호교환적으로 사용되며 동물 또는 수용자의 면역 반응의 일부로서 작용하는 구조적으로 연관된 단백질의 수 가지 부류 모두를 가리킨다. 이러한 단백질은 IgG, IgD, IgE, IgA, IgM 및 관련된 단백질을 포함한다.
- [0247] 정상적인 생리학적 조건하에서 항체는 혈장 및 기타 체액 및 특정 세포의 막에서 발견되며 B 세포라고 하는 유형의 림프구 또는 작용상 이들의 동등 세포에 의해 생성된다. IgG 부류의 항체는 4개의 폴리펩타이드 쇠가 디설파이드 결합에 의해 함께 연결되어 구성된다. 완전한 IgG 분자의 4개 쇠는 H-쇄라고 하는 2개의 동일한 중쇄와 L-쇄라고 하는 2개의 동일한 경쇄이다.
- [0248] 폴리클로날 항체를 생성하기 위해 토끼 또는 염소와 같은 숙주를 일반적으로 보조제와 함께 그리고 필요한 경우 담체에 결합된 상태로 항원 또는 항원 단편으로 면역화한다. 이어서 숙주의 혈청으로부터 항원에 대한 항체를 수거한다. 폴리클로날 항체는 이를 단일특이적으로 만드는 항원에 대해 친화성 정제할 수 있다.
- [0249] 모노클로날 항체는 항원으로 적당한 공여자를 과면역화하여 생성하거나 비장으로로부터 유래된 비장 세포 또는 세포주의 일차 배양물을 사용하여 생체외에서 생성할 수 있다 (Anavi, 1998; Huston et al., 1991; Johnson et al., 1991; Mernaugh et al., 1995).
- [0250] 본원 명세서 및 특허청구범위에 사용된 용어 "항체의 면역학적 부분"은 항체의 Fab 단편, 항체의 Fv 단편, 항체의 중쇄, 항체의 경쇄, 항체의 중쇄와 경쇄로 이루어진 헤테로이량체, 항체의 경쇄의 가변 단편, 항체의 중쇄의 가변 단편 및 항체의 단일 쇠 변이체 (또한 scFv로 알려져 있음)을 포함한다. 또한, 이 용어는 한 종이 사람일 수 있는 (이 경우 키메라 면역글로불린은 사람화된 것으로 일컫는다) 상이한 종으로부터 유래된 융합 유전자의 발현 생성물인 키메라 면역글로불린을 포함한다. 전형적으로, 항체의 면역학적 부분은 이의 기원이 되는 완전한 항체와 항원에 대한 특이적 결합을 위해 경쟁한다.

- [0251] 임의로, 항체 또는 바람직하게는 항체의 면역학적 부분은 다른 단백질과의 융합 단백질에 화학적으로 결합되거나 융합 단백질로서 발현될 수 있다. 본원 명세서 및 특허청구범위의 목적을 위해 모든 그러한 융합된 단백질은 항체 또는 항체의 면역학적 부분의 정의에 포함된다.
- [0252] 본원에 사용된 용어 "면역원성 물질" 또는 "면역원" 또는 "항원"은 수용자에게 단독으로, 보조제와 배합하여 또는 제시 비히클에 제시되어 투여했을 때 그 자체에 대한 면역학적 반응을 유도할 수 있는 분자를 기술하기 위해 상호교환적으로 사용된다.
- [0253] D. 치료 방법
- [0254] 본 발명의 방법은 스타필로코커스 병원체에 의해 발생된 질환 또는 증세의 치료를 포함한다. 본 발명의 면역원성 폴리펩타이드는 스타필로코커스로 감염된 사람 또는 스타필로코커스에 노출된 것으로 의심되는 사람에서 면역 반응을 유도하기 위해 투여될 수 있다. 방법은 스타필로코커스에 대한 노출이 양성으로 시험된 개체 또는 가능한 노출을 기준으로 감염 위험이 있는 것으로 여겨지는 개체에게 사용될 수 있다.
- [0255] 특히, 본 발명은 스타필로코커스 감염, 특히 병원에서 획득한 원내 감염의 치료 방법을 포함한다. 본 발명의 면역원성 조성물 및 백신은 대기 수술의 환자에게 사용하는 것이 특히 유리하다. 이러한 환자는 미리 수술 날짜를 알고 있고 미리 집중될 것이다. 본 발명의 면역원성 조성물 및 백신은 또한 의료 종사자에게 집중하는데 사용하는 것이 유리하다.
- [0256] 일부 양태에서, 조성물은 보조제 또는 담체 또는 다른 스타필로코커스 항원의 존재하에 투여된다. 또한, 일부 예에서 치료는 세균 감염에 대해 흔히 사용되는 다른 물질, 예를 들어 하나 이상의 항생물질을 투여하는 것을 포함한다.
- [0257] 백신접종을 위한 펩타이드의 사용은 반드시 그러한 것은 아니지만 B형 간염 표면 항원, 열쇠 구멍 삿갓조개 헤모시아닌 또는 소 혈청 알부민과 같은 면역원성 담체 단백질에 펩타이드의 결합을 필요로 할 수 있다. 이러한 결합을 수행하는 방법은 본 분야에 잘 알려져 있다.
- [0258] VI. 백신 및 다른 약제학적 조성물 및 투여
- [0259] E. 백신
- [0260] 본 발명은 스타필로코커스 감염, 특히 병원에서 획득된 원내 감염의 예방 또는 경감 방법을 포함한다. 이러한 경우로서 본 발명은 능동 및 수동 면역화 양태 모두에 사용하기 위한 백신을 포함한다. 백신으로 사용하기에 적합한 것으로 제안된 면역원성 조성물은 SpA 도메인 D 변이체 또는 면역원성 코아글라제와 같은 면역원성 SpA 폴리펩타이드로부터 제조될 수 있다. 다른 양태로서, SpA 또는 코아글라제는 다른 분비된 병원성 단백질, 표면 단백질 또는 이의 면역원성 단편과 배합하여 사용될 수 있다. 특정한 관점에서, 항원성 물질은 원치않는 작은 분자량 분자를 제거하기 위해 광범위하게 투석되고/되거나 바람직한 비히클내로의 보다 용이한 제형을 위해 동결건조된다.
- [0261] 단백질/펩타이드-기본 백신을 위한 다른 옵션은 DNA 백신으로서 항원을 암호화한 핵산을 도입하는 것을 포함한다. 이와 관련하여, 최근의 보고서에서 10개의 연속 최소 CTL 에피토프 (Thomson, 1996) 또는 수 가지 미생물로부터 B 세포, 세포독성 T-림프구 (CTL)와 T-헬퍼 (Th) 에피토프의 조합 (An, 1997)을 발현하는 재조합 백신이나 바이러스의 제작 및 이러한 작제물을 보호 면역 반응을 초회자극하기위해 마우스를 면역화하는데 성공적으로 사용한 것이 기술되었다. 따라서, 보호 면역 반응의 효율적인 생체내 초회자극을 위하여 펩타이드, 펩타이드-펄스된 항원 제시 세포 (APC) 및 펩타이드-암호화 작제물을 성공적으로 사용한 것에 대하여 문헌에 충분한 증거가 있다. 백신으로서 핵산 서열의 사용은 미국특허 제5,958,895호 및 제5,620,896호에 예시되어 있다.
- [0262] 활성 성분으로서 폴리펩타이드 또는 펩타이드 서열을 함유하는 백신의 제조는 일반적으로 분야에서 잘 이해되고 있으며 미국특허 제4,608,251호, 제4,601,251호, 제4,599,231호, 제4,599,230호, 제4,596,792호 및 제4,578,770호에 예시되어 있다. 이들 특허의 내용은 본원에 참조로 인용된다. 전형적으로, 이러한 백신은 액체 또는 현탁제와 같은 주사제로서 제조된다. 또한 주사전에 액체 중에서 용액 또는 현탁액을 위해 적합한 고체 형태가 제조될 수 있다. 또한, 제제는 유회될 수 있다. 활성적인 면역원성 성분은 약제학적으로 허용되고 활성 성분과 혼화가능한 부형제와 혼합된다. 적합한 부형제의 예로는 물, 염수, 텍스트로즈, 글리세롤, 에탄올 등 또는 이들의 혼합물을 들 수 있다. 또한, 필요한 경우, 백신은 습윤제, 유회제, pH 완충제 또는 백신의 효능을 강화하는 보조제와 같은 보조 물질을 함유할 수 있다. 특정 양태로서, 백신은 미국특허 제6,793,923호 및

제6,733,754호에 기술된 바와 같은 물질의 배합으로 제형화된다. 이들 특허의 내용은 본원에 참고로 인용된다.

- [0263] 백신은 통상적으로 비경구, 주사, 예를 들어 피하 또는 근육내로 투여될 수 있다. 다른 투여 방식에 적합한 추가의 제형은 좌제 및 일부의 경우로 경구제형을 포함한다. 좌제를 위한 종래의 결합제 및 담체는 예를 들어 폴리알칼렌 글리콜 또는 트리글리세라이드를 포함할 수 있다. 이러한 좌제는 활성 성분을 약 0.5% 내지 약 10%, 바람직하게는 약 1% 내지 약 2%의 범위로 함유한 혼합물로부터 형성될 수 있다. 경구제형은 보통 사용되는 부형제를 포함하며, 예로서 약제학적 등급의 만니톨, 락토즈, 전분, 마그네슘 스테아레이트, 나트륨 사카린, 셀룰로즈, 탄산마그네슘 등을 들 수 있다. 이들 조성물은 액제, 현탁제, 정제, 환제, 캡슐, 지속방출제형 또는 산제로 제형화되며 약 10% 내지 약 95%, 바람직하게는 약 25% 내지 약 70%의 활성 성분을 함유한다.
- [0264] 폴리펩타이드 및 폴리펩타이드-암호화 DNA 작제물은 중성 또는 염 형태로서 백신으로 제형화될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 염은 산 부가 염 (펩타이드의 유리 아미노 그룹과 형성됨) 및 무기산 (예: 염산 또는 인산) 또는 유기산 (예: 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 만델산 등)과 형성된 것을 포함한다.
- [0265] 전형적으로, 백신은 용량적 제제와 일치하는 방식 및 치료학적으로 효과적이고 면역원성을 나타내는 양으로 투여된다. 투여량은 개체의 면역계가 항체를 합성하는 능력 및 목적하는 예방 정도를 포함한 치료 피검체에 의존한다. 투여에 필요한 활성 성분의 정확한 양은 행위자의 판단에 좌우된다. 그러나, 적합한 용량 범위는 백신 접종당 활성 성분의 수 백 그램 정도이다. 초기 투여 및 추가 접종에 적합한 요법은 또한 다양하지만 초기 투여에 이어 후속 접종 또는 다른 투여를 실행하는 것이 전형적이다.
- [0266] 투여 방식은 매우 다양할 수 있다. 백신의 투여를 위한 종래의 방법중 어느 것도 적용될 수 있다. 이들은 생리학적으로 허용되는 고형 염기내에서 또는 생리학적으로 허용되는 분산액으로의 경구 투여, 비경구 투여, 주사 등을 포함한다. 백신의 용량은 투여 경로에 좌우되며 피검체의 크기 및 건강에 따라 다양할 수 있다.
- [0267] 특정 예로서, 백신을 수회 투여, 예를 들어 2, 3, 4, 5, 6회 또는 그 이상으로 투여하는 것이 바람직하다. 백신 접종은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8주 내지 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12주 간격 (이들 사이의 모든 범위를 포함함)으로 이루어질 수 있다. 1-5년의 간격을 둔 주기적 추가 접종이 항체의 예방 수준을 유지하는데 바람직하다. 면역화의 과정은 미국특허 제3,791,932호, 제4,174,384호 및 제3,949,064호에 기술된 바와 같이 항원에 대한 항체를 검정하는 것이 수반될 수 있다.
- [0268] 1. 담체
- [0269] 해당 조성물은 면역원성에서 다양할 수 있다. 따라서, 담체에 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 결합시켜 달성할 수 있는 바와 같이, 숙주 면역계에 추가 접종하는 것이 필요하다. 바람직한 담체의 예는 열쇠구멍 샷샷 조개 헤모시아닌 (KLH) 및 소 혈청 알부민 (BSA)이다. 난알부민, 마우스 혈청 알부민 또는 토끼 혈청 알부민과 같은 다른 알부민이 또한 담체로 사용될 수 있다. 폴리펩타이드를 담체 단백질에 결합시키는 수단은 본 분야에 잘 알려져 있으며 글루타르알데하이드, m-말레이미도벤조일-N-하이드록시석신이미드 에스테르, 카르보디이미드 및 비스-비아조화된 벤지딘을 포함한다.
- [0270] 2. 보조제
- [0271] 폴리펩타이드 또는 펩타이드 조성물의 면역원성은 보조제로 알려진 면역 반응의 비특이적 자극제의 사용에 의해 강화될 수 있다. 적합한 보조제는 사이토카인, 독소 또는 합성 조성물과 같은 모든 허용가능한 면역자극 화합물을 포함한다. 많은 보조제를 사용하여 변이 SpA 폴리펩타이드 또는 코아글라제 또는 본원에 고려된 다른 세균 단백질 또는 배합물에 대한 항체 반응을 강화할 수 있다. 보조제는 (1) 체내 항원을 포획하여 서서히 방출하거나, (2) 면역 반응에 연관된 세포를 투여 부위로 유인하거나, (3) 면역계 세포의 증식 또는 활성화를 유도하거나, (4) 피검체의 체내 전체에 항원의 확산을 향상시킬 수 있다.
- [0272] 보조제는 이들로 한정되는 것은 아니지만 수중유 에멀전, 유중수 에멀전, 미네랄 염, 폴리뉴클레오타이드 및 천연 물질을 포함한다. 사용될 수 있는 특정 보조제는 IL-1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, γ -인터페론, GMCSP, BCG, 알루미늄 염 (예: 수산화알루미늄 또는 다른 알루미늄 염), MDP 화합물 (예: thur-MDP 및 nor-MDP), CGP (MTP-PE), 지질 A 및 모노포스포릴 지질 A (MPL)을 포함한다. 세균으로부터 추출된 세 가지 성분인 MPL, 트레할로즈 디마이콜레이트 (TDM) 및 세포벽 골격 (CWS)를 2% 스쿠알렌/트윈 80 에멀전에서 함유한 RIBI가 사용될 수 있다. MHC 항원 조차 사용될 수 있다. 다른 보조제 또는 방법이 미국특허 제6,814,971호, 제5,084,269호 및 제6,656,462호에 예시되어 있다. 이들 특허의 내용은 본원에 참고로 인용된다.
- [0273] 백신을 위한 보조제 효과를 달성하는 여러 가지 방법은 흔히 인산염 완충된 염수 중에서 약 0.05% 내지 약 0.1%

용액으로 사용되는 수산화알루미늄 또는 인산알루미늄 (alum)과 같은 물질의 사용, 약 0.25% 용액으로 사용되는 당의 합성 중합체 (Carbopol®)와의 혼합물, 약 70°C 내지 약 101°C의 온도로 30초 내지 2분간의 열처리에 의한 백신중의 단백질의 침전을 포함한다. 알루미늄에 대한 펩신-처리된 (Fab) 항체로 재활성화에 의한 침전, 세균 세포 (예: 씨. 파르툼), 엔도톡신 또는 그람-음성 세균의 리포폴리사카라이드 성분과의 혼합, 생리학적으로 허용되는 오일 비히클 (예: 만니드 모노-올레에이트 (Aracel A)) 중에 에멀전 또는 차단 치환체로 사용되는 퍼플루오로카본 (Fluosol-DA®)의 20% 용액으로 에멀전이 또한 보조제 효과를 제공하는데 사용될 수 있다.

[0274] 바람직한 보조제의 예로는 완전 프로인트 보조제 (사멸된 마이코박테리움 투버쿨로시스를 함유한 면역 반응의 비특이적 자극제), 불완전 프로인트 보조제 및 수산화알루미늄을 포함한다.

[0275] 일부 관점에서, 보조제는 Th1 또는 Th2형의 반응의 우선적 유도제인 것으로 선택하는 것이 바람직하다. 고 수준의 Th1-형 사이토카인은 주어진 항원에 대해 세포 매개된 면역 반응의 유도를 촉진하는 경향이 있는 한편, 고 수준의 Th2-형 사이토카인은 항원에 대해 체액성 면역 반응의 유도를 촉진하는 경향이 있다.

[0276] Th1 및 Th2-형 면역 반응의 구분은 확실한 것은 아니다. 실제로, 개체는 주로 Th1 또는 주로 Th2인 것으로 기술되는 면역 반응을 지지한다. 그러나, 모스만 및 코프만 (Mosmann and Coffman, 1989)에 의해 쥐 CD4+ T 세포 클론에서 기술된 것의 관점에서 사이토카인의 계열을 고려하는 것이 흔히 편리하다. 전통적으로, Th1-형 반응은 T-림프구에 의한 INF- γ 및 IL-2 사이토카인의 생성과 연관이 있다. Th1-형 면역 반응의 유도와 흔히 직접적으로 관련된 다른 사이토카인은 IL-12와 같은 T-세포에 의해 생성되지 않는다. 대조적으로, Th2-형 반응은 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10의 분비와 관련이 있다.

[0277] 보조제 이외에, 면역 반응을 강화하기 위해 생물학적 반응 변형제 (BRM)을 동시 투여하는 것이 바람직할 수 있다. BRM은 T 세포 면역을 상향 조절하거나 억제 세포 활성을 하향 조절하는 것으로 제시되어 왔다. 이러한 BRM은 이들로 한정되는 것은 아니지만 시메티딘 (CIM; 1200 mg/d)(Smith/Kline, PA) 또는 저용량 사이클로포스파미드 (CYP; 300 mg/m²)(Johnson/Mead, NJ) 및 사이토카인 (예: γ -인터페론, IL-2 또는 IL-12) 또는 면역 헬퍼 기능에 연관된 단백질 (예: B-7)을 암호화한 유전자를 포함한다.

[0278] F. 지질 성분 및 잔기

[0279] 특정 양태로서, 본 발명은 핵산 또는 폴리펩타이드/펩타이드와 연관된 하나 이상의 지질을 포함한 조성물에 관한 것이다. 지질은 물에 녹지 않고 유기 용매에 의해 추출될 수 있는 물질이다. 본원에 특정적으로 기술된 것 외에 다른 화합물이 지질로서 본 분야의 숙련가에게 알려져 있으며 이들 화합물은 본 발명의 조성물 및 방법에 포함된다. 지질 성분 및 비-지질은 서로 공유적으로 또는 비공유적으로 결합될 수 있다.

[0280] 지질은 천연 지질 또는 합성 지질일 수 있다. 그러나, 지질은 보통 생물학적 물질이다. 생물학적 지질은 본 분야에 잘 알려져 있으며 예로서 중성 지방, 인지질, 포스포글리세라이드, 스테로이드, 테르펜, 라이소지질, 글라이코스핀고지질, 당지질, 설패타이드, 에테르와 에스테르-연결된 지방산을 갖는 지질 및 중합체성 지질 및 이들의 배합물을 포함한다.

[0281] 지질과 연관된 핵산 분자 또는 폴리펩타이드/펩타이드가 지질을 함유한 용액 중에 분산되거나, 지질로 용해되거나, 지질로 유화되거나, 지질과 혼합되거나, 지질과 배합되거나, 지질과 공유 결합되거나, 지질 중의 현탁액으로서 함유되거나, 다른 한편으로 지질과 조합될 수 있다. 본 발명의 지질 또는 지질-포क्स바이러스-조합된 조성물은 어떤 특정 구조로 한정되지 않는다. 예를 들어, 이들은 또한 단순히 용액 중에 산재되어 가능하게는 크기나 모양에서 일정하지 않은 응집체를 형성할 수 있다. 다른 예로, 이들은 미셀로서 이분자막 구조안에 또는 "붕괴된" 구조로 존재할 수 있다. 다른 비제한 예로서, 리포펙타민(Gibco BRL)-포क्स바이러스 또는 슈퍼펙트(Qiagen)-포क्स바이러스 복합체가 또한 고려된다.

[0282] 특정 양태로서, 조성물은 약 1%, 약 2%, 약 3%, 약 4%, 약 5%, 약 6%, 약 7%, 약 8%, 약 9%, 약 10%, 약 11%, 약 12%, 약 13%, 약 14%, 약 15%, 약 16%, 약 17%, 약 18%, 약 19%, 약 20%, 약 21%, 약 22%, 약 23%, 약 24%, 약 25%, 약 26%, 약 27%, 약 28%, 약 29%, 약 30%, 약 31%, 약 32%, 약 33%, 약 34%, 약 35%, 약 36%, 약 37%, 약 38%, 약 39%, 약 40%, 약 41%, 약 42%, 약 43%, 약 44%, 약 45%, 약 46%, 약 47%, 약 48%, 약 49%, 약 50%, 약 51%, 약 52%, 약 53%, 약 54%, 약 55%, 약 56%, 약 57%, 약 58%, 약 59%, 약 60%, 약 61%, 약 62%, 약 63%, 약 64%, 약 65%, 약 66%, 약 67%, 약 68%, 약 69%, 약 70%, 약 71%, 약 72%, 약 73%, 약 74%, 약 75%, 약 76%, 약 77%, 약 78%, 약 79%, 약 80%, 약 81%, 약 82%, 약 83%, 약 84%, 약 85%, 약 86%, 약 87%, 약 88%, 약 89%,

약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 또는 이들 사이의 모든 범위의 특정 지질, 지질 형 또는 비-지질 성분 (예: 보조제, 항원, 펩타이드, 폴리펩타이드, 당, 핵산 또는 본원에 기술된 또는 본 분야의 숙련자에게 알려진 다른 물질)을 포함할 수 있다. 비제한적인 예로서, 조성물은 약 10% 내지 약 20%의 중성 지질 및 약 33% 내지 약 34%의 세레브로사이드 및 약 1%의 콜레스테롤을 포함할 수 있다. 다른 비제한적인 예로서, 리포솜은 약 4% 내지 약 12%의 테르펜, 약 10% 내지 약 35%의 포스포티딜콜린 및 약 1%의 비-지질 성분을 함유할 수 있으며, 여기서 미셀의 약 1%가 특정적으로 라이코펜이므로 리포솜의 약 3% 내지 약 11%가 다른 테르펜을 포함한다. 따라서, 본 발명의 조성물은 지질, 지질 유형 또는 다른 성분중 어떠한 것도 어떠한 배합으로 또는 비율 범위로도 포함할 수 있다.

[0283] G. 병용 요법

[0284] 본 발명의 조성물 및 관련 방법, 특히 환자에게 변이 SpA 폴리펩타이드 또는 펩타이드 및/또는 다른 세균 펩타이드 또는 단백질을 포함한 분비된 병원성 인자 또는 표면 단백질의 투여는 또한 종래 요법의 투여와 병용하여 사용될 수 있다. 이들은 이로 한정되는 것은 아니지만 스트렙토마이신, 시프로플록사신, 독시사이클린, 젠타마이신, 클로람페니콜, 트리메토프림, 설파메톡사졸, 암피실린, 테트라사이클린 또는 여러 항생물질의 배합과 같은 항생물질의 투여를 포함한다.

[0285] 한 가지 관점으로, 폴리펩타이드 백신 및/또는 요법이 항균 치료와 병용하여 사용되는 것이 고려된다. 다른 방안으로서, 이 요법이 수분 내지 수주의 간격을 두고 다른 물질 요법에 선행적으로 또는 후속으로 실시될 수 있다. 다른 치료제 및/또는 단백질 또는 폴리펩타이드가 별도로 투여되는 양태에 있어서, 당업자는 일반적으로 각 투여의 시간 사이에 중요한 기간이 만료되지 않고 다른 치료제와 항원성 조성물이 피검체에게 유리한 병용 효과를 여전히 발휘할 수 있음을 이해한다. 그러한 예로서, 당업자는 서로 약 12-24시간내에 또는 서로 약 6-12시간내에 두 치료 양식을 투여할 수 있음이 고려된다. 일부 상황에서 투여 기간을 상당히 연장하는 것이 바람직할 수 있는데, 이 경우 수일 (2, 3, 4, 5, 6 또는 7) 내지 수주 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8주)가 각 투여사이에 경과할 수 있다.

[0286] 여러 가지 병용이 사용될 수 있으며, 예를 들면 항생제 요법은 "A"이고 면역요법의 처방의 일부로서 투여되는 면역원성 분자 (예: 항원)는 "B"라고 하면 다음과 같은 병용을 포함한다:

[0287] 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

[0288] B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

[0289] B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

[0290] 환자/피검체에게 본 발명에 따른 면역원성 조성물의 투여는 SpA 조성물 또는 본원에 기술된 다른 조성물의 독성을 고려하여 그러한 화합물의 투여에 대한 일반적으로 프로토콜을 따른다. 치료 주기는 필요한 만큼 반복되는 것으로 예상된다. 또한, 수화과 같은 여러 가지 표준 요법이 기술된 요법과 병용하여 적용될 수 있음이 고려된다.

[0291] H. 일반적인 약제학적 조성물

[0292] 일부 양태에서, 약제학적 조성물이 피검체에게 투여된다. 본 발명의 다른 관점은 피검체에게 유효량의 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 본 발명의 일부 양태에서, 스타필로코커스 항원, Ess 경로의 일원 (Esa 또는 Esx 부류의 폴리펩타이드 또는 펩타이드를 포함함) 및/또는 소르타제 기질의 일원을 환자에 투여하여 한 가지 이상의 스타필로코커스 병원체에 의한 감염에 대해 예방을 할 수 있다. 다른 방안으로서, 하나 이상의 그러한 폴리펩타이드 또는 펩타이드를 암호화한 발현 벡터를 예방 치료로서 환자에 투여할 수 있다. 추가로, 그러한 화합물은 항생제 또는 항균제와 배합하여 투여할 수 있다. 이러한 조성물은 일반적으로 약제학적으로 허용되는 담체 또는 수성 매질 중에 용해되거나 분산된다.

[0293] 정맥내 또는 근육내 주사를 위한 것과 같은 비경구 투여를 위해 제형화된 화합물이외에 다른 약제학적으로 허용되는 형태는 예를 들어 정제 또는 경구 투여를 위한 다른 고형제, 시간 방출성 캡슐 및 현재 사용되고 있는 모든 다른 형태 (크립, 로션, 구강세척제, 흡입제 등)를 포함한다.

[0294] 본 발명의 활성 화합물은 비경구 투여를 위해 제형화될 수 있는데, 예를 들면 정맥내, 근육내, 피하 또는 복강

내 경로를 통한 주사제로 제형화될 수 있다. MHC 부류 I 분자의 발현을 증가시키는 화합물 또는 화합물들을 함유하는 수성 조성물의 제조는 본 명세서의 측면에서 본 분야 숙련가에 알려진 것이다. 전형적으로, 이러한 조성물은 액체 또는 현탁제의 주사제로서 제조되거나, 주사전에 액체의 첨가에 의해 용액 또는 현탁액을 제조하기 위해 적합하게 사용되는 고형제가 또한 제조될 수 있으며 이 제제는 또한 유화될 수 있다.

- [0295] 유리 염기 또는 약물학적으로 허용되는 염으로서의 활성 화합물의 용액이 하이드록시프로필셀룰로스와 같은 계면활성제와 적당히 혼합된 물 중에서 제조될 수 있다. 또한, 글리세롤, 액상 폴리에틸렌 글라이콜 및 이들의 혼합물 및 오일중에서 분산액으로 제조할 수 있다. 저장 및 사용의 통상적인 조건하에서 이들 제제는 미생물의 성장을 예방하기 위해 보존제를 함유한다.
- [0296] 주사용으로 적합한 약제 형태는 멸균 수용액 또는 분산액; 참깨유, 낙화생유 또는 수성 프로필렌 글리콜을 포함한 제제; 및 멸균 주사액 또는 현탁액의 즉석 제조를 위한 멸균 산제를 포함한다. 모든 경우에 형태는 무균이어야 하고 쉽게 주사될 수 있을 정도로 유동적이어야 한다. 또한, 제조 및 저장 조건하에서 안정해야 하며 세균 및 진균과 같은 미생물의 오염 작용에 대하여 보존되어야 한다.
- [0297] 단백질성 조성물은 중성 또는 염 형태로 제형화될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 염은 예를 들어 염산 또는 인산과 같은 무기산 또는 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 만델산 등과 같은 유기산과 형성되는 산 부가 염 (단백질의 유리 아미노 그룹과 형성됨)을 포함한다. 유리 카르복실 그룹과 형성된 염이 또한 예를 들어 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘 또는 수산화제2철과 같은 무기 염기 및 이소프로필아민, 트리메틸아민, 히스티딘, 프로카인 등과 같은 무기 염기로부터 수득될 수 있다.
- [0298] 또한, 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리에올 (예: 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액상 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 적합한 혼합물 및 식물성유를 함유한 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적당한 유동성은 예를 들어 렉시틴과 같은 피복제의 사용에 의해, 분산제의 경우 필요한 입도의 유지에 의해 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물 작용의 예방은 여러 가지 항균제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산, 티메로살 등에 의해 달성될 수 있다. 많은 경우에서 등장성 물질, 예를 들어 당 또는 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직하다. 주사용 조성물의 연장된 흡수는 조성물에 흡수 지연제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 사용하여 달성할 수 있다.
- [0299] 멸균 주사액은 필요량의 활성 화합물을 상기 열거된 여러 성분과 함께 적절한 용매중에 혼입시키고 필요한 경우 여과로 멸균시켜 제조한다. 일반적으로, 분산액은 여러 가지 멸균된 활성 성분을 기본 분산 매질과 상기 열거된 것중에서 필요한 다른 성분을 함유한 멸균 비히클내로 혼입시켜 제조한다. 멸균 주사액의 제조를 위한 멸균 산제의 경우에, 바람직한 제조 방법은 진공 건조 및 동결 건조 기술이다. 이러한 기술은 사전에 멸균-여과된 용액으로부터 활성 성분과 추가의 필요한 성분의 분말을 제공한다.
- [0300] 본 발명에 따른 조성물의 투여는 전형적으로 통상의 경로중 어느 것을 통해서도 가능하다. 이것은 이들로 한정되는 것은 아니지만 경구, 비내 또는 구강 투여를 포함한다. 다른 방안으로서, 투여는 동소성, 경피, 피하, 근육내, 복강내, 비내 또는 정맥내 주사에 의한 것일 수 있다. 특정 양태로서, 백신 조성물은 흡입될 수 있다 (예: 미국특허 제6,651,655호, 이의 내용은 특정적으로 본원에 참고로 인용된다). 일반적으로 이러한 조성물은 생리학적으로 허용되는 담체, 완충제 또는 다른 부형제를 포함한 약제학적으로 허용되는 조성물로서 투여된다. 본원에 사용된 용어 "약제학적으로 허용되는"은 올바른 의학적 판단의 범위안에서 과도한 독성, 자극, 알러지 반응 또는 합리적 손익비와 비례하는 기타 부작용의 발생 없이 사람과 동물의 조직과 접촉하는데 적합한 화합물, 물질, 조성물 및/또는 용량 형태를 가리킨다. 용어 "약제학적으로 허용되는 담체"는 화합물질을 보유하거나 이송하는데 연관된 약제학적으로 허용되는 물질, 조성물 또는 비히클 (예: 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제, 용매 또는 캡슐화제)을 의미한다.
- [0301] 수용액에 의한 비경구 투여의 경우, 예를 들어 용액은 필요한 경우 적당히 완충되어야 하며 우선적으로 액체 희석제가 충분한 염수 또는 글루코즈와 등장성으로 되어야 한다. 이들 특정 수용액은 특히 정맥내, 근육내, 피하 및 복강내 투여에 적합하다. 이와 관련하여, 사용될 수 있는 멸균 수성 매질은 본 발명의 내용 측면에서 본 분야의 숙련가에게 알려진 것이다. 예를 들면, 한 용량이 등장성 NaCl 용액 중에 용해되고 피하주액에 첨가되거나 제시된 주입 부위에 주사될 수 있다 (참조예: Remington's Pharmaceutical Sciences, 1990). 용량의 일부 변화가 피검체의 상태에 따라 불가결하게 일어날 수 있다. 투여의 책임자는 어떠한 경우든 개별 피검체에 적당한 용량을 결정할 수 있다.
- [0302] 치료 또는 예방 조성물의 유효량은 의도된 목적에 맞춰 결정된다. 용어 "단위 용량" 또는 "용량"은 피검체에게

사용하기에 적합한 물리적으로 구분된 단위를 가리키며, 각 단위는 투여, 즉 적절한 경로 및 요법과 관련하여 위에서 논의된 원하는 반응을 생성하기 위해 계산된 조성물의 예정량을 함유한다. 치료 횟수 및 단위 용량에 따른 투여량은 목적하는 예방에 의해 좌우된다.

[0303] 또한 조성물의 정확한 양은 의사의 판단에 의해 결정되며 개체마다 다르다. 용량에 영향을 미치는 인자는 피검체의 신체 및 임상 상태, 투여 경로, 의도하는 치료 목적 (중세의 경감 대 치료) 및 특정 조성물의 효능, 안정성 및 독성을 포함한다.

[0304] 제형화시 용액은 용량 제제와 혼합되는 방식으로 및 치료 또는 예방적으로 효과적인 양으로 투여된다. 이 제제는 다양한 용량형으로, 예컨대 상기된 주사 용액의 형태로 간편하게 투여된다.

[0305] I. 시험관내, 생체의 또는 생체내 투여

[0306] 본원에 사용된 용어 "시험관내 투여"는 이들로 한정되는 것은 아니지만 배양물 중의 세포를 포함하여 피검체로부터 또는 피검체의 외부로 제거된 세포에 실시된 조작을 가리킨다. 용어 "생체의 투여"는 시험관내에서 조작되어 후속적으로 피검체에게 투여되는 세포를 가리킨다. 용어 "생체내 투여"는 피검체내부에서 실시된 모든 조작을 포함한다.

[0307] 본 발명의 특정한 관점에서, 조성물은 시험관내, 생체의 또는 생체내로 투여될 수 있다. 특정 시험관내 양태로서, 자가 B-림프구 세포주가 본 발명의 바이러스 벡터와 24 내지 48시간 동안 또는 본원에 기술된 변이 SpA 및/또는 코아풀라제 및/또는 모든 다른 조성물과 2시간 동안 배양된다. 이어서, 형질도입된 세포는 시험관내 분석을 위해 또는 다르게는 생체의 투여를 위해 사용될 수 있다. 미국특허 제4,690,915호 및 제5,199,942호 (이들 특허 내용은 본원에 참고로 인용된다)는 치료에 사용하기 위한 혈액 단핵 세포 및 골수 세포의 생체의 조작을 위한 방법을 기술한다.

[0308] J. 항체 및 수동 면역화

[0309] 본 발명의 다른 관점은 수용자 또는 공여자를 본 발명의 백신으로 면역화하고 수용자 또는 공여자로부터 면역글로불린을 분리하는 단계를 포함하여 스타필로코커스 감염의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 면역글로불린을 제조하는 방법이다. 이 방법에 의해 제조된 면역글로불린은 본 발명의 추가의 관점이다. 본 발명의 면역글로불린 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한 약제학적 조성물은 스타필로코커스 질병의 치료 또는 예방을 위한 약물을 제조하는데 사용될 수 있는 본 발명의 추가 관점이다. 본 발명에 따른 약제의 유효량을 환자에게 투여하는 단계를 포함하여 스타필로코커스 감염을 치료 또는 예방하는 방법은 본 발명의 추가적인 관점이다.

[0310] 폴리클로날 항체 생성을 위한 접종물은 전형적으로 항원성 조성물을 염수 또는 수성 조성물을 형성하여 사람에게 사용하기에 적합한 다른 보조제와 같은 생리학적으로 허용되는 희석제중에 분산시켜 제조한다. 접종물의 면역자극 양을 포유동물에 투여하고 이어서 접종된 포유동물은 항원성 조성물이 방어 항체를 유도하기에 충분한 시간 동안 유지된다.

[0311] 항체는 친화성 크로마토그래피 (Harlow and Lane, 1988)와 같이 잘 알려진 기술에 의해 목적하는 정도로 분리할 수 있다. 항체는 흔히 사용되는 여러 동물, 예를 들어 염소, 영장류, 당나귀, 돼지, 말, 기니아 피그, 랫트 또는 사람으로부터의 항혈청 제제를 포함할 수 있다.

[0312] 본 발명에 따라 생성된 면역글로불린은 완전한 항체, 항체 단편 또는 소단편을 포함할 수 있다. 항체는 모든 부류 (예: IgG, IgM, IgA, IgD 또는 IgE)의 완전한 면역글로불린, 키메릭 항체 또는 본 발명의 항원 두 가지에 대해 이중 특이성을 갖는 하이브리드 항체일 수 있다. 이들은 또한 하이브리드 단편을 포함한 단편 (예: F(ab')₂, Fab', Fab, Fv 등)일 수 있다. 또한 면역글로불린은 특이 항원과 결합하여 복합체를 형성함으로써 항체와 같이 작용하는 천연, 합성 또는 유전자 조작된 단백질도 포함한다.

[0313] 본 발명의 백신은 특이적 백신으로의 시험감염에 반응하여 생성된 면역글로불린의 원천으로서 작용하는 수용자에게 투여될 수 있다. 이렇게 접종된 피검체는 혈장을 공여하며, 이러한 혈장으로부터 통상적인 혈장 분획법을 통해 고도면역 글로불린을 수득한다. 고도면역 글로불린은 다른 피검체에게 스타필로코커스 감염에 대한 내성을 부여하거나 스타필로코커스 감염을 치료하기 위해 투여된다. 본 발명의 고도면역 글로불린은 유아, 면역약화된 개체의 스타필로코커스 질환을 치료 또는 예방하는데 특히 유용하거나 치료가 필요하고 개체가 백신접종에

반응하여 항체 생성할 시간이 없는 곳에서 스타필로코커스 질환을 치료 또는 예방하는데 특히 유용하다.

[0314] 본 발명의 추가 관점은 본 발명에 따른 면역원성 조성물의 성분중 적어도 두 가지에 대하여 반응성인 두 가지 이상의 모노클로날 항체 (또는 이의 단편, 바람직하게는 사람 또는 사람화된 단편)를 포함하고 그람 양성 세균, 바람직하게는 포도상구균, 더욱 바람직하게는 에스. 아우레우스 또는 에스. 에피더미디스에 의한 감염을 치료 또는 예방하는데 사용될 수 있는 약제학적 조성물이다. 이러한 약제학적 조성물은 모든 부류의 완전한 면역글로불린일 수 있는 모노클로날 항체, 키메라 항체 또는 본 발명의 항원중 둘 이상에 대해 특이성을 갖는 하이브리드 항체를 포함한다. 이들은 또한 하이브리드 단편을 포함하여 단편 (예: F(ab')₂, Fab', Fab, Fv 등)일 수 있다.

[0315] 모노클로날 항체를 제조하는 방법은 본 분야에 잘 알려져 있으며 골수종 세포와 비장세포의 융합을 포함할 수 있다 (Kohler and Milstein, 1975; Harlow and Lane, 1988). 다른 방안으로서, 적합한 파아지 디스플레이 라이브러리를 스크리닝함으로써 모노클로날 Fv 항체를 수득할 수 있다 (Vaughan et al., 1998). 모노클로날 항체는 공지 방법에 의해 사람화 또는 부분 사람화될 수 있다.

[0316] VII. 실시예

[0317] 하기 실시예는 본 발명의 다양한 양태를 설명하기 위한 목적으로 제공되고 있으며 본 발명을 어떠한 형태로든 제한하는 것이 아니다. 본 분야 숙련가는 본 발명의 목적을 실시하고 언급된 결과 및 이점뿐만 아니라 본 발명 고유의 목적, 결과 및 이점을 얻을 수 있도록 본 발명이 잘 적용됨을 쉽게 알 수 있을 것이다. 본원에 기술된 방법과 함께 본 실시예는 특정 양태를 대표하는 것이며 본 발명의 범위를 한정하는 의도가 아니다. 본원 특허 청구범위에 기술된 바와 같은 본 발명의 취지에 속하는 변화 및 기타 사용들은 본 분야의 숙련가가 생각할 수 있을 것이다.

[0318] 실시예 1

[0319] 스타필로코커스 아우레우스 감염을 예방하기 위한 서브유닛 백신으로서 비-독소발생성 단백질 A 변이체

[0320] 에스. 아우레우스 감염용 동물 모델 사람 임상 분리주 에스. 아우레우스 뉴만 1x10⁷ CFU를 정맥내 주사하여 BALB/c 마우스를 감염시켰다(Baba et al., 2007). 감염 후 6시간 내에, 스타필로코커스 99.999%가 혈류에서 사라지고 혈관구조를 통해 분배되었다. 최초 3시간 내에 신장과 다른 말초 기관 조직 내의 세균 부하량이 1x10⁵ CFU g⁻¹에 이르렀을 때, 말초 조직으로 스타필로코커스의 파종은 빠르게 일어났다. 신장 조직에 스타필로코커스 부하량은 24시간 내에 1.5 log CFU로 증가했다. 감염 48시간 후, 마우스의 다양한 기관에서는 헤마톡실린-에오신 염색한 박편화된 신장 조직의 광학 검경법에 검출할 수 있는 농양 파종이 발생했다. 초기 농양 직경은 524 μM(± 65 μM)이었고; 병변은 다형핵성 백혈구(PMN)의 유입에 의해 처음으로 표시되었고, 식별가능한 스타필로코커스 조직이 존재하지 않고, 대부분의 스타필로코커스는 PMN 내에 주재하는 것으로 나타났다. 감염 5일째, 농양은 크기가 증가했고 호산성 무정형 물질 층과 PMN의 큰 커프(cuff)로 둘러싸인 스타필로코커스의 중심 집단을 포위했다. 조직병리 검사는 건강한 식세포 맨틀뿐 아니라 농양 병변 중심에서 스타필로코커스 병소에 근접한 PMN의 대량 괴사를 밝혀냈다. 농양 병변의 둘레에서는 병변으로부터 건강한 신장 조직을 분리하는 호산성 무정형 물질을 경계시키는 괴사성 PMN 테두리가 관찰되었다. 농양은 결국 15일 또는 36일째 ≥1,524 μM의 직경에 이르렀다. 이후 시간 간격에서, 스타필로코커스 부하량은 10⁴ - 10⁶ CFU g⁻¹으로 증가했고 성장하는 농양 병변은 기관 협막쪽으로 이동했다. 말초 병변은 파열하기 쉽고, 이에 따라 괴사 물질과 스타필로코커스를 복강 또는 복막뒤 공간으로 방출시킨다. 이러한 사건들은 세균혈증뿐 아니라 농양의 2차 파장을 초래하여, 결과적으로 치명적인 결과를 촉진시켰다.

[0321] 신장 조직에 스타필로코커스 부하량을 계수하기 위해, 동물을 사망시키고, 이의 신장을 절제하여, 조직 파쇄액을 콜로니 형성용 한천 배지에 도말했다. 감염 5일째, 에스. 아우레우스 뉴만은 평균 1x10⁶ CFU g⁻¹ 신장 조직이 관찰되었다. 농양 형성을 정량분석하기 위해, 신장을 육안으로 조사하고, 각 개체의 기관을 1 또는 0의 점수로 매겼다. 최종 합계는 총 신장 수로 나누어 표면 농양의 백분율을 계산했다(표 3). 또한, 무작위로 선택한 신장을 포르말린으로 고정하고, 포매시킨 뒤, 박편화한 다음 헤마톡실린-에오신으로 염색했다. 각 신장마다, 200 μM 간격으로 4개의 시상면 단편을 검경법으로 관찰했다. 각 단편마다 병변의 수를 계수하고, 평균을 구해 신장

신장 조직에서 제거되었고, 이는 야생형에 비해 $\geq 3.5 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$ 감소된 것이다(표 3). 따라서, 소르타제 A 고정된 표면 단백질은 농양 병변의 형성 및 숙주 조직 내에 세균의 지속을 가능하게 하며, 여기서 스태피로코커스는 세포의 기질에 매립되고, 무정형 가성협막에 의해 주위 백혈구로부터 차폐된 공동체로서 복제한다.

[0325] 소르타제 A는 LPXTG 모티프 분류 시그널을 보유한 광범위한 단백질을 세포벽 엔벨로프에 고정시키고, 이로써 많은 독성 인자들을 표면 발현시킨다(Mazmanian et al., 2002). 스태피로코커스 농양 형성에 필요한 표면 단백질을 확인하기 위해, 버사 아우레알리스(*bursa aurealis*) 삽입체를 LPXTG 모티프 단백질을 보유한 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자의 5' 암호화 서열에 도입시키고(Bae et al., 2004), 이 돌연변이를 에스.아우레우스 뉴만에 형질도입시켰다. 단백질 A의 구조 유전자 중의 돌연변이(*spa*)는 감염된 마우스 신장 조직에서 스태피로코커스 부하량을 $1.004 \log_{10}$ 감소시켰다($P=0.0144$). 조직병리 검사로 신장 조직에 농양을 형성하는 능력에 대해 분석했을 때, 본 발명자들은 *spa* 돌연변이체가 야생형 모 균주 에스.아우레우스 뉴만에 비해 농양을 형성할 수 없었다는 것을 관찰했다(야생형 에스.아우레우스 뉴만 4.364 ± 0.889 농양/신장 대 동종 *spa* 돌연변이체 0.375 ± 0.374 병변; $P = 0.0356$).

[0326] **단백질 A는 선천적 및 후천적 면역 반응을 차단한다.** 연구들은 단백질 A를 에스.아우레우스 감염의 발병기전 동안 중요한 독성 인자로 확인했다. 초기 연구는 단백질 A가 면역글로불린의 Fc 성분에 결합하여 스태피로코커스의 식세포작용을 방해하고(Jensen 1958; Uhlen et al., 1984), 폰 빌레브란트 인자를 통해 혈소판 응집을 활성화하며(Hartleib et al., 2000), VH3 보유 IgM의 F(ab)₂ 영역을 포획하여 B 세포 상과항원으로서 작용하며(Roben et al., 1995), TNFR1의 활성화를 통해 스태피로코커스 폐렴을 개시시킬 수 있다(Gomez et al., 2004)는 것을 증명했다. 단백질 A가 면역글로불린을 포획하고 독성 특성을 발현한다는 사실로 인해, 이 표면 분자가 사람의 백신으로서 작용할 수 있을 것이라는 가능성은 철저하게 입증된 적이 없다. 본 발명자들은 처음으로 단백질 A 변이체가 더 이상 면역글로불린에 결합할 수 없고, vWF 및 TNFR-1이 이들의 독소발생 가능성이 제거되어 스태피로코커스 질환에 대해 보호하는 체액 면역반응을 자극할 수 있다는 것을 증명한다.

[0327] **단백질 A 표면 제시 및 기능의 분자 기반.** 단백질 A는 세균 세포질의 전구체로서 합성되고 관통 벽, 즉 스태피로코커스의 세포 분열 격막에서 YSIRK 시그널 펩타이드를 통해 분비된다(도 1A).(DeDent et al., 2007; DeDent et al., 2008). C-말단 LPXTG 분류 시그널의 절단 후, 단백질 A는 소르타제 A에 의해 세균 펩티도글리칸 크로스 브릿지에 고정된다(Schneewind et al., 1995; Mazmanian et al., 1999; Mazmanian et al., 2000). 단백질 A는 스태피로코커스의 가장 풍부한 표면 단백질이고; 이 분자는 사실상 모든 에스.아우레우스 균주에 의해 발현된다(Said-Salim et al., 2003; Cespedes et al., 2005; Kennedy et al., 2008). 스태피로코커스는 분열 주기마다 자신의 세포벽의 15 내지 20%를 턴오버(turn over)시킨다(Navarre and Schneewind 1999). 쥐의 가수분해효소는 펩티도글리칸의 글리칸 가닥과 벽 펩타이드를 절단하여, C-말단 세포벽 디사카라이드 테트라펩타이드가 부착된 단백질 A를 세포의 배지로 방출시킨다(Ton-That et al, 1999). 따라서, 생리적 디자인에 의해 단백질 A는 세포 벽에 고정되고 세균 표면에서 발현되지만, 숙주 감염 동안에는 주위 조직으로 방출된다(Marraffini et al., 2006).

[0328] 단백질 A는 세균 표면에서 면역글로불린을 포획하고 이 생화학적 활성은 숙주의 선천적 및 후천적 면역 반응으로부터 스태피로코커스가 탈출할 수 있게 해준다(Jensen 1958; Goodyear and Silverman 2004). 흥미로운 점은, LPXTG 분류 시그널/세포벽 앵커에 IgG 결합 도메인을 구속시키는 반복 도메인인 단백질 A의 영역 X(Guss et al., 1984)는 아마도 스태피로코커스 계놈의 가장 가변성인 부위이다(Schneewind et al., 1992; Said-Salim et al., 2003). 3개의 나선 번들로 구성되고 E, D, A, B 및 C라 지칭한, 단백질 A의 5개 면역글로불린 결합 도메인(SpA)은 각각 유사한 구조적 및 기능적 성질을 발휘한다(Sjodahl 1977; Jansson et al., 1998). 도메인 D의 분해 및 결정 구조는 다른 부위에서 비경쟁적 방식으로 단백질 A에 결합하는 Fc 및 V_H3(Fab) 리간드의 존재 및 부재 하에 밝혀냈다(Graille et al., 2000).

[0329] 결정 구조 복합체에서, Fab는 4개의 VH 영역 β-가닥으로 구성된 표면을 통해 도메인 D의 나선 II 및 나선 III 과 상호작용한다(Graille et al., 2000). 도메인 D의 나선 II의 주축은 가닥의 배향과 약 50° 를 이루고 있고, 도메인 D의 나선간 부위는 C0 가닥에 가장 근접해 있다. Fab 상의 상호작용 부위는 Ig 경쇄 및 중쇄 불변 영역 으로부터 떨어져 위치한다. 상호작용은 다음과 같은 도메인 D 잔기를 수반한다: SpA-D를 보유한 여러 다른 잔기 들 외에, 나선 II의 Asp-36, 나선 II와 나선 III 사이의 루프에 존재하는 Asp-37 및 Gln-40(Graille et al., 2000). 상호작용성 양 표면은 도메인 D에 3개의 음하전 잔기 및 상호작용에 의해 매립된 2A2 Fab에 2개의 양하 전 잔기를 보유하는 극성 측쇄로 주로 구성되어, 두 분자 사이에 전반적인 정전기적 인력을 제공한다. Fab와 도

메인 D 사이에서 확인된 5개의 극성 상호작용 중에서 3개는 측쇄 사이에 존재한다. Arg-H19와 Asp-36 사이에는 염 가교가 형성되고, Tyr-H59와 Asp-37 사이, 그리고 Asn-H82a와 Ser-33 사이에는 2개의 수소 결합이 형성된다. 단백질 A의 총 5개 IgG 결합 도메인에서 Asp-36과 Asp-37의 보존됨으로 인해, 이 잔기들이 돌연변이유발에 선택되었다.

[0330] Fab 결합에 책임이 있는 SpA-D 부위는 Fc γ 결합을 매개하는 도메인 표면과 구조적으로 분리되어 있다. Fc γ 와 도메인 B의 상호작용은 주로 나선 I의 잔기를 수반하고, 이보다 적게 나선 II가 관여한다(Deisenhofer 1981; Gouda et al., 1992). 양 복합체에서 미약하게 접촉한 Gln-32 외에는, Fc γ 상호작용을 매개하는 잔기는 Fab 결합에 전혀 관여하지 않는다. 이러한 다른 Ig-결합 부위 간에 공간적 관계를 조사하기 위해, 이 복합체들 중의 SpA 도메인을 증충시켜 Fab, SpA-도메인 D 및 Fc γ 분자 간에 복합체 모델을 작제했다. 이러한 3원 모델에서, Fab 및 Fc γ 는 각 상호작용의 입체 장애의 흔적 없이 나선 II의 대향 면에 대하여 샌드위치를 형성한다. 이러한 발견들은 SpA 도메인이 그 작은 크기(즉, 56-61 aa)에도 불구하고 어떻게 SpA 도메인이 양쪽 활성을 동시에 발현하여 Fab와 각 도메인의 상호작용이 비경쟁적이라는 실험 증거를 설명해줄 수 있는지를 예시한다. SpA-D와 Fc γ 사이의 상호작용 잔기는 Gln-9 및 Gln-10이다.

[0331] 이에 반해, 도메인 D에 대한 IgG의 Fc 부위의 점유는 vWF A1 및 아마도 또한 TNFR1과의 상호작용을 차단한다(O'Seaghdhat et al., 2006). IgG Fc 결합에 필요한 잔기(F5, Q9, Q10, S11, F13, Y14, L17, N28, I31 및 K35)의 돌연변이도 역시 vWF A1과 TNFR1 결합에 필요하며(Cedergren et al., 1993; Gomez et al., 2006; O'Seaghdhat et al., 2006), 이에 반해 V α 3 상호작용에 중요한 잔기(Q26, G29, F30, S33, D36, D37, Q40, N43, E47)는 IgG Fc, vWF A1 또는 TNFR1의 결합 활성화에 어떠한 영향도 미치지 않았다(Jansson et al., 1998; Grille et al., 2000). 단백질 A 면역글로불린 Fab 결합 활성화는 VH3 패밀리를 관련 IgM을 표면에서 발현하는 B 세포 서브세트를 표적으로 하며, 즉 이 분자들은 VH3 타입 B 세포 수용체로서 작용한다(Roben et al., 1995). SpA와 상호작용 시, 상기 B 세포들은 빠르게 증식한 뒤, 아포토시스에 할당되어, 선천성-유사 B 림프구의 우선적이고 장기적인 결실(즉, 변연부 B 세포 및 소포 B2 세포)을 초래한다(Goodyear and Silverman 2003; Goodyear and Silverman 2004). 혈행 B 세포의 40% 이상이 단백질 A 상호작용에 의해 표적화되고 VH3 패밀리가 병원체에 대한 방어적 체액 반응을 부여하는 사람 B 세포 수용체의 가장 큰 패밀리는 것을 유의하는 것이 중요하다(Goodyear and Silverman 2003; Goodyear and Silverman 2004). 따라서, 단백질 A는 스타필로코커스 초항원과 유사하게 기능하지만(Roben et al., 2005), 후자의 분자 클래스, 예컨대 SEB, TSST-1, TSST-2는 T 세포 수용체와 복합체를 형성하여 숙주 면역 반응을 부적절하게 자극하여 스타필로코커스 감염의 특징적인 질환 특징을 촉진시킨다(Roben et al., 1995; Tiedemann et al., 1995). 이러한 발견들은 모두 스타필로코커스 감염의 확립 및 숙주 면역 반응의 조절에 있어서 단백질 A의 기여를 증명해보인다.

[0332] **단백질 A의 비-독소발생성 변이체.** 본 발명자들은 스타필로코커스 단백질 A의 비-독소발생성 변이체를 개발했고, 연구 중인 이 시약을 가지고, 먼저 단백질 A 면역화에 대한 동물의 면역 반응을 측정하고자 했다. 또한, 본 발명자들은 단백질 A의 비-독소발생성 변이체를 이용한 동물의 면역화가 스타필로코커스 감염에 대한 방어 면역을 유발하는 면역 반응을 생성할 수 있는지를 다룬다.

[0333] 단백질 A의 IgG Fc, vWF A1 및 TNFR1 결합 활성을 교란시키기 위해, 글루타민(Q) 잔기 9와 10[여기의 번호는 확립된 SpA 도메인 D에서 유래하는 것이다]은 두 글루타민을 리신 또는 글리신 치환시키는 변형으로 처리했고, 이 치환들은 야생형 단백질 A와 이의 리간드 사이에 형성된 이온 결합을 없앨 것으로 예상된다. 이중 리신 치환의 추가 효과는 이 양하전성 잔기들이 면역글로불린에 대해 반발 전하를 일으키는 것일 수 있다. IgM Fab VH3 결합을 교란시키기 위해, 본 발명자들은 B 세포 수용체와 단백질 A의 결합에 각각 필요로 하는 SpA-D의 아스파르트이트(D) 잔기 36 및 37을 선택했다. D36 및 D37은 둘 모두 알라닌으로 치환시켰다. Q9, 10K 및 D36,37A 돌연변이를 재조합 분자 SpA-D_{Q9,10K:D36,37A}에 조합시키고, 단백질 A의 결합 속성에 대해 조사했다.

[0334] 간략히 설명하면, 스타필로코커스 아우레우스 N315의 단백질 A(*spa*) 게놈 서열은 프라이머 (GCTGCACATATGGCGCAACACGATGAAGCTCAAC [5' 프라이머](서열번호 35) 및 AGTGGATCCTATGCTTTGTTAGCATCTGC [3' 프라이머] (서열번호 36))로 PCR 증폭시키고, pET15b 벡터(pYSJ1, 코돈 48-486)에 클로닝하고(Stranger-Jones, et al., 2006), 재조합 플라스미드를 이. 콜라이 BL21(DE3) 내로 형질전환시켰다(Studier et al., 1990). pYSJ1 유래의 단백질 A 산물은 N-말단 His 태그(MGSSHHHHHSSGLVPRGS(서열번호 37))에 융합된 SpA 잔기 36-265를 수용한다. IPTG 유도 발현 후, 재조합 N-말단 His₆-태그화된 SpA는 Ni-NTA 수지 상의 친화성 크로마토그래피에 의해 정제되었다(Stranger-Jones et al., 2006). SpA의 도메인 D(SpA-D)는 한 쌍의 특정 프라이머 (AACATATGTTCAACAAAGATCAACAAGC [5' 프라이머](서열번호 38) 및 AAGGATCCAGATTCGTTAATTTTATAGC [3'

프라이머] (서열번호 39))로 PCR 증폭시키고, pET15b 벡터(pHAN1, *spa* 코돈 212-261)에 서브클로닝하여, 재조합 플라스미드로 이.콜라이 BL21(DE3)을 형질전환시켜 재조합 N-말단 His₆-태그화된 단백질을 발현시켜 정제했다. SpA-D 암호화 서열에 돌연변이를 만들기 위해, 두쌍의 프라이머 세트를 합성했다(D를 A로 치환시키기 위해: CTCATTCAAAGTCTTAAAGCCGCCCAAGCCAAAGCACTAAC [5' 프라이머] (서열번호 40) 및 GTTAGTGCTTTGGCTTGGGGCGGCTTAAAGACTTTGAATGAAG [3' 프라이머] (서열번호 41); Q를 K로 치환시키기 위해 CATATGTTCAACAAAGATAAAAAAGCGCCTTCTATGAAATC [5' 프라이머] (서열번호 42) 및 GATTCATAGAAGGCGCTTTTTTATCTTTGTTGAACATATG [3' 프라이머](서열번호 43); Q를 G로 치환시키기 위해, CATATGTTCAACAAAGATGGAGGAAGCGCCTTCTATGAAATC [5' 프라이머] (서열번호 44) 및 GATTCATAGAAGGCGCTTCCTCCATCTTTGTTGAACATATG' [3' 프라이머] (서열번호 45). 프라이머들은 급속-변화 돌연변이 유발 프로토콜에 사용했다. 돌연변이 유발 후, 각 재조합 단백질마다 DNA 서열을 확인했다: SpA, SpA-D 및 SpA-D_{Q9,10G:D36,37A} 및 SpA-D_{Q9,10K:D36,37A}. 단백질은 모두 재조합 이.콜라이 용해물로부터 Ni-NTA 크로마토그래피를 사용하여 정제하고 이어서 PBS에 대해 투석한 뒤 4°C에 보관했다.

[0335] 단백질 A 및 이의 변이체에 대한 면역글로불린의 결합성을 측정하기 위해, 200 μg의 정제된 단백질을 컬럼 완충액(50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH7.5)을 사용해 1ml 용적으로 희석하고, 그 다음 예비-평형화된 Ni-NTA 컬럼(1ml 총 용적) 위에 로딩했다. 컬럼은 10ml 컬럼 완충액으로 세척했다. 정제된 사람 IgG 200 μg을 총 용적 1ml의 컬럼 완충액에 희석한 뒤, 단백질 A 및 이의 변이체가 충전된 각 컬럼에 적용했다. 컬럼은 이어서 5ml 세척 완충액(컬럼 완충액에 10mM 이미다졸) 및 5ml 컬럼 완충액으로 세척했다. 단백질 샘플은 2ml 용출 완충액(컬럼 완충액 중에 500mM 이미다졸)으로 용출시키고, 분획을 수집하여 분취량을 SDS-PAGE 겔 전기영동으로 처리한 다음, 쿠마시-블루 염색 처리했다. 도 1C에 도시된 바와 같이, 야생형 단백질 A(SpA) 및 이의 SpA-도메인 D는 모두 크로마토그래피 동안 면역글로불린을 보유했다. 이에 반해, SpA-D_{Q9,10K:D36,37A} 변이체는 면역글로불린에 결합하지 않았다.

[0336] 단백질 A 및 이의 변이체가 면역글로불린의 Fc 부위 및 Fab의 VH3 도메인, HRP 접합된 사람 면역글로불린 G[hIgG], 사람 IgG의 Fc 부위[hFc] 및 사람 IgG의 F(ab)₂[hF(ab)₂]에 결합하는 정도를 정량분석하고 ELISA 분석을 사용하여 단백질 A 및 이의 변이체에 대한 상대적 결합량을 정량분석했다. 도 1D의 데이터는 SpA 및 SpA-D의 hIgG 및 hFc에 대한 결합성을 입증하는 반면, SpA-D_{Q9,10G:D36,37A} 및 SpA_{Q9,10K:D36,37A}는 오로지 배경 결합 활성만을 나타냈다. SpA는 유사한 양의 hFc 및 hF(ab)₂에 결합했지만, hF(ab)₂에 대한 SpA-D의 결합성은 전체 길이의 SpA에 비해 감소했다. 이 결과는 다수의 IgG 결합 도메인의 존재가 B 세포 수용체에 결합하는 단백질 A의 능력을 협동적으로 증가시킬 수 있다는 것을 시사한다. hF(ab)₂에 대한 SpA-D의 결합력 감소와 비교했을 때, 두 변이체 중 SpA-D_{Q9,10K:D36,37A}만이 면역글로불린의 VH3 도메인에 결합하는 능력에 유의적인 감소를 나타냈다. SpA-D 및 이의 변이체의 독소발생 속성을 조사하기 위해, 정제 단백질을 마우스에 주사했고, 4시간 후 마우스를 희생시키고 비장을 분리했다. 기관 조직을 파쇄하고 협막 물질을 제거한 뒤, B 세포를 형광 CD19 항체로 염색했다. 비장 조직에서 B 세포의 풍부함을 정량분석하는 FACS 분석 후, SpA-D가 모의(PBS) 대조군에 비해 B 세포 수를 5% 감소시키는 것을 관찰했다(도 1E). 이에 반해, SpA-D_{Q9,10K:D36,37A}는 B-세포 수의 감소를 일으키지 않았고, 이는 돌연변이 분자가 B 세포 증식 및 사멸을 자극하는 독소발생 속성을 상실했음을 시사한다(도 1E). 이를 요약하면, SpA-D 잔기 Q9, Q10, D36 및 D37의 아미노산 치환은 면역글로불린에 결합하는 단백질 A 도메인의 능력을 없애거나, 사람 및 동물 조직에서 독소발생 기능을 발휘한다.

[0337] **비-독소발생성 단백질 A 변이체는 백신 방어를 유도해낸다.** 단백질 A 및 이이 변이체가 백신 항원으로서 작용할 수 있는지 또는 아닌지를 검사하기 위해, SpA, SpA-D, SpA-D_{Q9,10G:D36,37A} 및 SpA-D_{Q9,10K:D36,37A}를 완전 및 불완전 프로인트 보강제로 유화시키고, 1일 및 11일째 4주령의 BALB/c 마우스를 50μg의 정제된 단백질로 면역화시켰다. 동물 코호트(n=5)는 면역화 스케줄 전(0일) 및 후(21일)에 동물로부터 채혈하여 면역화에 대한 체액 면역 반응을 분석했다. 표 4는 면역화된 마우스가 야생형 단백질 A 또는 이의 SpA-D 모듈에 지향성인 중간 정도의 체액 면역 반응을 발생시키는 반면, SpA-D_{Q9,10G:D36,37A} 및 SpA-D_{Q9,10K:D36,37A}로 면역화한 후에 유발되는 항체의 양은 4 내지 5배 증가했다는 것을 보여준다. 1x10⁷ CFU의 에스.아우레우스 뉴만으로 정맥내 시험감염시킨 후, 동물을 4 일째 사망시키고, 이들의 신장을 분리하여 스타필로코커스 부하량(조직 파쇄액을 한천 플레이트에 도말하고 콜로니 형성 단위, CFU를 계수하여) 또는 조직병리에 대해 분석했다. 예상한 바와 같이, 모의(PBS) 면역화된 마우스(n=19)는 신장 조직에 6.46 log₁₀(±0.25) CFU를 수용했고, 감염성 병변은 기관(n=10)당 3.7개(±1.2) 농양의

로 조직되었다(표 4). SpA로의 동물의 면역화는 5일째 2.51 log₁₀ CFU 감소를 초래하고 기관당 2.1개(±1.2) 농양이 형성되었다. 후자의 데이터는 농양 형성에 유의적인 감소가 없었음을 시사한다(P=0.35). SpA-D로의 면역화도 유사한 결과를 나타냈다: 5일째 2.03 log₁₀ CFU의 감소(P=0.0001) 및 기관당 1.5개(±0.8) 농양(P=0.15). 이에 반해, SpA-D_{Q9,10G:D36,37A} 또는 SpA-D_{Q9,10K:D36,37A}로의 면역화는 방어성을 증가시켜, 4일째 각각 3.07 log₁₀ 및 3.03 log₁₀ CFU 감소를 각각 나타냈다(두 관찰의 통계 유의성 P<0.0001). 또한, SpA-D_{Q9,10G:D36,37A} 또는 SpA-D_{Q9,10K:D36,37A}로의 면역화는 기관당 감염성 병변이 0.5개(±0.4) 및 0.8개(±0.5)만이 확인되었는 바, 스타필로코커스 농양 형성에 대한 유의적인 방어성을 발생시켰다. 따라서, 비-독소발생성 단백질 A 변이체로의 면역화는 단백질 A에 대한 증가된 체액 면역 반응을 발생시키고 스타필로코커스 시험감염에 대한 방어 면역성을 제공한다. 이러한 데이터는 단백질 A가 에스. 아우레우스 질환을 예방하는 사람 백신에 이상적인 후보라는 것을 시사한다.

[0338]

이러한 흥미로운 결과는 사람 백신을 설계하는데 여러 암시를 제공한다. 첫째, 단독 도메인 또는 2 이상의 도메인 조합에서 단백질 A의 면역글로불린 결합 도메인의 능력에 영향을 미치는 치환 돌연변이의 발생은 백신 개발에 적합한 비-독소발생성 변이체를 발생시킬 수 있다. 단백질 A의 구조와 매우 닮은 돌연변이 IgG 결합 도메인의 조합은 SpA-도메인 D만에 대해 여기에 보고된 바와 같이 훨씬 우수한 체액 면역 반응을 발생시킬 수 있을 것처럼 보인다. 또한, 단백질 A 특이적 항체의 유망한 속성은 미생물 표면과 항원 결합 부위의 상호작용이, Fc 부위를 통해 면역글로불린을 포획하거나 또는 VH3 결합 활성을 통해 B 세포 수용체를 자극하는 스타필로코커스의 능력을 중화시킬 수 있다는 것일 수 있다.

표 4

항원	신장에서의 세균 부하량 (n=마우스 수)		IgG 역가		마우스에서의 농양 형성 (n=마우스 수)	
	^a log ₁₀ CFU g ⁻¹	^b 감소율	^c p 값	^d 표면 농양	감소율	^e p 값
모의	6.46 ± 0.25 (n=19)	—	—	14/19 (70%)	—	—
SpA	3.95 ± 0.56 (n=20)	2.51	0.0003	1706 ± 370 (50%)	32%	2.2 ± 1.2 (n=10)
SpA-D	4.43 ± 0.41 (n=18)	2.03	0.0001	381 ± 27 (55%)	25%	2.2 ± 0.8 (n=10)
SpA-D1	3.39 ± 0.50 (n=19)	3.07	<0.0001	5600 ± 801 (30%)	59%	0.5 ± 0.4 (n=10)
SpA-D2	3.43 ± 0.46 (n=19)	3.03	<0.0001	3980 ± 676 (32%)	57%	0.8 ± 0.5 (n=10)

^a 18 내지 20마리 BALB/c 마우스의 코호트에서 감염 4일 후 파쇄된 신장 조직 중의 log₁₀ CFU g⁻¹로 계산된 평균 스타필로코커스 부하량. 평균의 표준 오차 (±SEM)도 표시했다.
^b 통계유의성은 스투던츠 t-검정으로 계산하고 P 값을 기록했다; P 값 <0.05는 유의성으로 간주했다.
^c 세균 부하량의 감소는 log₁₀ CFU g⁻¹로 계산했다.
^d 감염 4일 후 신장 조직 중의 농양 형성은 육안 검사로 측정했다 (양성 %). 동물 10마리 유래의 헤마톡실린-에오신 염색된, 박편화된 신장의 조직병리검사; 신장당 농양의 수를 기록하고, 평균을 내어 최종 평균 (±SEM)을 구했다.
^e 통계적 유의성은 스투던츠 t-검정으로 계산하고 P 값을 기록했다; P 값 <0.05는 유의성으로 간주했다. SpA-D1 및 SpA-D2는 각각 SpA-D_{Q9,10K:D36,37A} 및 SpA-D_{Q9,10G:D36,37A}를 나타낸다.

[0339]

쥐의 농양, 쥐의 치명적 감염 및 쥐 폐렴 모델에서의 백신 방어. 이 3 동물 모델은 에스. 아우레우스 감염 질환의 연구를 위해 확립된 바 있다. 이 모델들을 사용하여 단백질 A 특이적 항체의 발생을 통해 제공되는 방어 면역성의 수준을 조사했다.

[0340]

[0341] **재료 및 방법**

[0342] 쥐 농양 - BALB/c 마우스(24일령 암컷, 8 내지 10 마우스/그룹, 찰스 리버 레보러토리즈, MA, Wilmington)는 뒷다리에 정제 단백질을 근육내 주사하여 면역화시켰다(Chang et al., 2003; Schneewind et al., 1992). 정제된 SpA, SpA-D 또는 SpA-DQ9,10K;D36,37A(50 μ g 단백질)을 0일째(완전 프로인트 보강제로 1:1 유화시킴) 및 11일째(불완전 프로인트 보강제로 1:1 유화시킴) 투여했다. 0일, 11일 및 20일째 안와후방 방혈로 혈액 샘플을 채혈했다. 특정 SpA-D 또는 SpA-DQ9,10K;D36,37A 결합 활성에 대한 IgG 역가에 대해 혈청을 ELISA로 조사했다. 면역화된 동물에게 21일째 100 μ l의 에스.아우레우스 뉴만 또는 에스.아우레우스 USA300 현탁액(1×10^7 cfu)을 안와후방으로 주사하여 시험감염했다. 이를 위해, 에스.아우레우스 뉴만의 밤샘 배양물을 새로운 트립틱 대두 브로쓰에 1:100으로 희석하고 37°C에서 3시간 동안 증식시켰다. 스타필로코커스를 원심분리하고, 2회 세척한 뒤, PBS로 희석하여 A_{600} 0.4(1×10^8 cfu/ml)를 수득했다. 희석은 한천 도말 및 콜로니 형성으로 실험적으로 확인했다. 마우스에게 80 내지 120 mg의 케타민과 3 내지 6mg의 실라진을 체중 1kg당 복강내 주사하여 마취하고 안와후방 주사로 감염시켰다. 시험감염 후 5일 또는 15일째, 마우스를 압축 CO₂ 흡입으로 안락사시켰다. 신장을 분리하여 1% Triton X-100에서 파쇄했다. 분취량을 희석하고 한천 배지에 도말하여 cfu를 3반복 측정했다. 조직 검사를 위해, 신장 조직을 실온에서 10% 포르말린에 넣고 24시간 동안 항온처리했다. 조직을 파라핀에 포매시키고 박편화한 뒤, 헤마톡실린-에오신으로 염색하고 검경법으로 조사했다.

[0343] **쥐 치명적 감염** - BALB/c 마우스(24일령 암컷, 그룹당 마우스 8 내지 10마리, 찰스 리버 레보레이토리즈, Wilmington, MA)는 정제된 SpA, SpA-D 또는 SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} (50 μ g 단백질)를 뒷다리에 근육내 주사하여 면역화했다. 백신은 0일(완전 프로인트 보강제로 1:1 유화시킴) 및 11일(불완전 프로인트 보강제로 1:1 유화시킴)째 투여했다. 혈액 샘플은 0일, 11일 및 20일째 안와후방 방혈로 채혈했다. 혈청은 특정 SpA-D 및 SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} 결합 활성에 대한 IgG 역가에 대해 ELISA로 조사했다. 면역화된 동물에게 21일째 100 μ l의 에스.아우레우스 뉴만 또는 에스.아우레우스 USA300 현탁액(15×10^7 cfu)을 안와후방으로 주사하여 시험감염시켰다(34). 이를 위해, 에스.아우레우스 뉴만의 밤샘 배양물을 새로운 트립틱 대두 브로쓰에 1:100으로 희석하고 37°C에서 3시간 동안 증식시켰다. 스타필로코커스를 원심분리하고, 2회 세척한 뒤, PBS로 희석하여 A_{600} 0.4(1×10^8 cfu/ml)를 수득했고, 농축했다. 희석은 한천 도말 및 콜로니 형성으로 실험적으로 확인했다. 마우스에게 80 내지 120 mg의 케타민과 3 내지 6mg의 실라진을 체중 1kg당 복강내 주사하여 마취했다. 면역화된 동물에게 2×10^{10} cfu의 에스.아우레우스 뉴만 또는 $3-10 \times 10^9$ cfu의 임상 에스.아우레우스 분리주를 복강내 주사하여 21일째 시험감염시켰다. 동물을 14일 동안 모니터하고, 치명적 질환을 기록했다.

[0344] **쥐 폐렴 모델** - 에스. 아우레우스 균주 뉴만 또는 USA300(LAC)을 트립틱 대두 브로쓰/한천에서 OD₆₆₀ 0.5까지 37°C에서 증식시켰다. 50ml 배양물 분취량을 원심분리하고, PBS로 세척한 뒤, 사망률 연구를 위해 750 μ l PBS에 현탁($3-4 \times 10^8$ CFU/30 μ l 용적)시키거나, 또는 세균 부하량 및 조직병리 실험을 위해 1,250 μ l PBS(2×10^8 CFU/30 μ l 용적)에 현탁시켰다(2,3). 폐 감염을 위해, 7주령의 C57BL/6J 마우스(The Jackson Laboratory)를 마취한 뒤, 왼쪽 비공(nare) 내로 에스.아우레우스 현탁액 30 μ l를 접종했다. 동물을 회복을 위해 반드시 뒤여 우리에 넣고 14일 동안 관찰했다. 능동 면역을 위해, 4주령의 마우스에게 CFA 중의 20 μ g SpA-D 또는 SpA-D_{Q9,10K;D36,37A}를 0일째 i.m. 경로를 통해 투여한 다음, 10일째 불완전 프로인트 보강제(IFA) 중의 20 μ g SpA-D 또는 SpA-D_{Q9,10K;D36,37A}를 추가 접종했다. 동물을 21일째 에스. 아우레우스로 시험감염시켰다. 면역화 전과 20일째에 혈청을 모아 특정 항체 생산을 평가했다. 수동 면역 연구를 위해서, 7주령의 마우스에게 NRS(정상 토끼 혈청) 또는 SpA-D-특이적 토끼 항혈청 100 μ l를 시험감염시키기 24시간 전에 복강내 주사를 통해 투여한다. 폐렴의 병리학적 상관관계를 평가하기 위해, 감염 동물을 강제 CO₂ 흡입시켜 사망시킨 뒤, 양쪽 폐를 분리했다. 오른쪽 폐는 폐의 세균 부하량을 계수하기 위해 파쇄했다. 왼쪽 폐는 1% 포르말린에 넣고, 파라핀 포매시키고 박편화한 뒤, 헤마톡실린-에오신으로 염색하고 검경법으로 분석했다.

[0345] **토끼 항체** - 토끼 항혈청을 생산하기 위한 면역원으로서, 정제된 200 μ g SpA-D 또는 SpA-D_{Q9,10K;D36,37A}를 사용했다. 단백질 200 μ g를 CFA로 유화시켜 0일째 주사한 뒤, 21일과 42일째는 IFA로 유화시킨 200 μ g 단백질을

추가 주사했다. 토끼 항체 역가는 ELISA로 측정했다. 정제된 항체는 SpA-D 또는 SpA-D_{Q9,10K:D36,37A} 세파로스에서 토끼 혈청의 친화성 크로마토그래피로 수득했다. 용출된 항체 농도는 A₂₈₀ 흡광도로 측정하고 특정 항체 역가는 ELISA로 측정했다.

[0346] **SpA-도메인 D 변이체를 이용한 능동 면역** - 백신 효능을 측정하기 위해, 동물을 정제된 SpA-D 또는 SpA-D_{Q9,10K:D36,37A}로 능동 면역화했다. 대조군으로, 동물을 보강제만으로 면역화했다. 단백질 A 제조물에 대한 항체 역가는 항원으로서 SpA-D 또는 SpA-D_{Q9,10K:D36,37A}를 사용하여 측정했고; SpA-D_{Q9,10K:D36,37A} 변이체는 IgG의 Fc 또는 Fab 부위에 결합할 수 없음을 유의한다. 전술한 감염 질환 모델을 사용하여 세균 부하량(쥐 농양 및 폐렴), 스타필로코커스 질환의 조직병리 증거(쥐 농양 및 폐렴) 및 치명적 질환에 대한 방어(쥐 치명적 시험감염 및 폐렴)에 있어서 임의의 감소를 측정했다.

[0347] **SpA-도메인 D 변이체에 대하여 발생된 친화성 정제된 토끼 폴리클로날 항체를 이용한 수동 면역.** 단백질 A 특정 토끼 항체의 방어 면역성을 측정하기 위해, 마우스를 정제된 SpA-D 또는 SpA-D_{Q9,10K:D36,37A} 유래의 토끼 항체 5mg/kg으로 수동 면역화했다. 이 두 항체 제조물은 고정된 SpA-D 또는 SpA-D_{Q9,10K:D36,37A}를 사용해 친화성 크로마토그래피로 정제했다. 대조군으로서, 동물은 rV10 항체(스타필로코커스 감염 결과에 어떠한 영향도 미치지 않는 플라크 방어 항원)로 수동 면역화했다. 모든 단백질 A에 대한 항체 역가는 항원으로서 SpA-D_{Q9,10K:D36,37A}를 사용하여 측정했는데, 그 이유는 이 변이체가 IgG의 Fc 또는 Fab 부위에 결합할 수 없기 때문이다. 전술한 감염성 질환 모델을 사용하여, 세균 부하량(쥐 농양 및 폐렴), 스타필로코커스 질환의 조직병리 증거(쥐 농양 및 폐렴) 및 치명적 질환에 대한 방어(쥐 치명적 시험감염 및 폐렴)에 있어서 감소율을 측정했다.

[0348] **실시예 2**

[0349] **메티실린-내성 스타필로코커스 아우레우스 감염에 대한 비-독소발생성 단백질 A 백신**

[0350] 에스. 아우레우스의 임상 분리주는 단백질 A(Shopsin et al., 1999, 이의 1차 해독 산물은 N-말단 시그널 펩타이드(DeDent et al., 2008), 5개의 Ig-BD(E, D, A, B 및 C라 지칭함)(Sjodahl, 1977), 8개 잔기 펩타이드의 가변성 반복체를 보유한 영역 X(Guss et al., 1984), 및 SpA의 세포벽 고정을 위한 C-말단 분류 시그널(Schneewind et al., 1992; Schneewind et al., 1995)(도 1A-1B)을 발현한다. 아미노산 상동성(Uhlen et al., 1984), IgBD의 3중 α-나선 다발 구조(Deisenhofer et al., 1978; Deisenhofer et al., 1981) 및 Fab V_H3(Graille et al., 2000) 또는 Fc γ(Gouda et al., 1998)와의 원자 상호작용의 지도에 따라, 항체 또는 B 세포 수용체 각각과 SpA의 결합에 중요한 인자로서 아스파르트레이트 36 및 37뿐만 아니라 글루타민 9 및 10을 선택했다. D 도메인에 치환 Gln9Lys, Gln10Lys, Asp36Ala 및 Asp37Ala을 도입시켜 SpA-D_{KKAA}를 생성했다(도 1B). 사람 IgG에 결합하는 분리된 SpA-D 또는 SpA-D_{KKAA}의 능력은 친화성 크로마토그래피로 분석했다(도 1D). 폴리히스틴 태그화된 SpA-D뿐만 아니라 전장의 SpA는 Ni-NTA 위의 사람 IgG를 머물게 한 반면, SpA-D_{KKAA} 및 음성 대조군(SrtA)은 그러지 못했다(도 1C). 유사한 결과는 종양 괴사 인자 수용체 1(TNFR1)(Gomez et al., 2004)과 함께 글루타민 9 및 10을 통해 단백질 A에 결합할 수도 있는 폰 빌레브란트 인자(Hartleib et al., 2000)에 의해 관찰되었다(도 1D). 사람 면역글로불린은 60-70% V_H3형 IgG를 포함한다. 본 발명자들은 Ig의 Fc 도메인 및 B 세포 수용체 활성화를 서로 구별하고, 사람 Fc γ 단편과 F(ab)₂ 단편의 결합을 측정했고, 이 단편들은 전체 길이의 SpA 또는 SpA-D에 결합하지만, SpA-D_{KKAA}에 결합하지 않았다(도 1D). 마우스의 복강에 SpA-D의 주사는 B 세포를 증대시킨 다음, BALB/c 마우스의 비장 조직에 있는 CD19+ 림프구를 아포토시스 붕괴시켰다(Goodyear and Silverman, 2003)(도 1E). B 세포 초항원 활성은 SpA-D_{KKAA}를 주사한 후에는 관찰되지 않았고, 비장 조직의 TUNEL-염색은 SpA 또는 SpA-D의 주사 후 아포토시스 세포의 증가를 검출하지 못했다(도 1E).

[0351] **SpA-D_{KKAA}에 대한 항체는 MSSA 및 MRSA 감염에 대해 방어한다.** 시험처리 받은 적이 없는 6주령의 BALB/c 마우스에게, CFA에 유화된 정제된 SpA, SpA-D 또는 SpA-D_{KKAA}를 각각 50 μg씩 주사하고 IFA에 유화된 동일 항원을 추가 주사했다. SpA-D가 활성화된 클로날 B 세포 집단의 아포토시스성 붕괴를 촉진한다는 가설과 일치하는 것으로, 본 발명자들은 비-독소발생성 변이체로 마우스를 면역화한 이후, B 세포 초항원과 비교했을 때 SpA-D_{KKAA} 특이적 항체의 10배 더 높은 역가를 관찰했다(SpA-D 대 SpA-D_{KKAA} P<0.0001, 표 5). 전체 길이의 SpA에 의한 면역화 시

에 유발된 항체 역가는 SpA-D에 의해 유발된 것보다 높았고($P=0.0022$), 이것은 이 항원의 더 큰 크기와 반복적인 도메인 구조 때문인 것으로 보인다(표 5). 그럼에도 불구하고, SpA는 단백질 A(520 잔기, 서열번호 33)의 50개 아미노산만을 포함하는 SpA-D_{KKAA}($P=0.0003$)보다 낮은 항체 역가를 유도해냈다. 면역화된 마우스를, 에스.아우레우스 뉴만을 정맥내 접종하여 시험감염시키고, 신장 조직 내의 농양을 살포하는 스타필로코커스의 능력은 시험감염 4일 후 부검하여 조사했다. 모의(PBS/보강제) 면역화된 마우스의 파쇄된 신장 조직에서는 $6.46 \log_{10}$ CFU g^{-1} 의 평균 스타필로코커스 부하량이 계수되었다(표 5). SpA 또는 SpA-D로의 마우스 면역화는 스타필로코커스 부하량을 감소시켰으나, SpA-D_{KKAA} 백신접종된 동물은 신장 조직에서 에스. 아우레우스 뉴만의 훨씬 큰 $3.07 \log_{10}$ CFU g^{-1} 감소율을 나타냈다($P<0.0001$, 표 5). 신장의 농양 형성은 조직병리 검사로 분석했다(도 2). 모의 면역화된 동물은 평균 $3.7(\pm 1.2)$ 개 농양을 보유했다(표 5). SpA-D_{KKAA} 백신접종은 농양의 평균 수를 $0.5(\pm 0.4)$ ($P=0.0204$)로 감소시킨 반면, SpA 또는 SpA-D 면역화는 농양 병변 수를 유의적으로 감소시키지 않았다(표 5). SpA-D_{KKAA} 백신접종된 동물의 병변은 크기가 작고, 침윤성 PMN의 수도 적었고, 스타필로코커스 농양 공동체가 특징적으로 부족했다(Cheng et al., 2009)(도 2). SpA 또는 SpA-D로 면역화된 동물의 농양은 모의 면역화된 동물의 병변과 전반적인 구조가 동일했다(도 2).

[0352] 본 발명자들은 SpA-D_{KKAA} 면역화가 MRSA 균주에 대하여 마우스를 방어할 수 있는지를 조사하고, 동물 시험감염을 위해 USA300 LAC 분리주를 선택했다(Diep et al., 2006). 이러한 고 독성인 CA-MRSA 균주는 미국 전역에 빠르게 전파되어, 유의적인 사람 질병률과 사망률을 유발한다(Kennedy et al., 2008). 보강제 대조 마우스와 비교했을 때, SpA-D_{KKAA} 면역화된 동물은 감염된 신장 조직의 세균 부하량이 감소된 $1.07 \log_{10}$ CFU g^{-1} 였다. 에스. 아우레우스 USA300 시험감염 후 신장 조직의 조직병리 검사는 평균 농양 수가 $4.04(\pm 0.8)$ 에서 $1.6(\pm 0.6)$ 으로 감소한 것으로 나타났다($P=0.02774$). 이에 반해, SpA 또는 SpA-D 면역화는 세균 부하량 또는 농양 형성을 유의적으로 감소시키지 않았다(표 5).

[0353] **SpA-D_{KKAA} 항체는 면역글로블린-단백질 A 상호작용을 방해한다.** 토끼를 SpA-D_{KKAA}로 면역화하고, 특이적 항체를 SpA-D_{KKAA} 친화성 컬럼과 그 다음 SDS-PAGE로 정제했다(도 3). SpA-D_{KKAA} 특이적 IgG는 펩신으로 절단하여 Fc γ 및 F(ab)₂ 단편으로 만들고, 후자를 SpA-D_{KKAA} 컬럼 크로마토그래피로 정제했다(도 3). SpA 또는 SpA-D에 대한 사람 IgG 또는 vWF의 결합은 SpA-D_{KKAA} 특이적 F(ab)₂에 의해 교란되었고, 이것은 SpA-D_{KKAA} 유래의 항체가 단백질 A의 B 세포 초항원 기능 및 이의 Ig과의 상호작용을 중화시킨다는 것을 시사한다(도 3).

[0354] **SpA_{KKAA}는 방어 면역 반응을 향상시킨다.** 비-독소발생성 단백질 A의 백신 성질을 더욱 향상시키기 위해, 본 발명자들은 5개 도메인(E, D, A, B 및 C) 각각에서 4개의 아미노산 치환, 즉 Gln9Lys, Gln10Lys, Asp36Ala 및 Asp37Ala에 대응하는 치환을 보유하는 총 5개의 IgBD를 포함하는 SpA_{KKAA}를 만들었다. 폴리히스티딘 태그화된 SpA_{KKAA}는 친화성 크로마토그래피로 정제하고 쿠마시 블루-염색된 SDS-PAGE로 분석했다(도 4). 전체 길이의 SpA와 달리, SpA_{KKAA}는 사람 IgG, Fc 및 F(ab)₂ 또는 vWF에 결합하지 않았다(도 4). SpA_{KKAA}는 BALB/c 마우스에 주사시, 비장 조직에서 CD19+ B 세포를 고갈시키지 않았으나, B 세포 초항원 활성을 나타내지 않았다(도 4). SpA_{KKAA} 백신접종은 SpA-D_{KKAA} 면역화보다 높은 특이적 항체 역가를 발생시켰고, 에스.아우레우스 USA300 시험감염에 대한 방어력이 상승된 마우스를 제공했다(표 5). 시험감염 4일 후, SpA_{KKAA} 백신접종된 동물은 신장 조직에 $3.54 \log_{10}$ CFU g^{-1} 적은 스타필로코커스를 보유했고($P=0.0001$), 농양 병변의 수를 더 많이 감소시켰다($P=0.0109$)(표 5). 단백질 A 백신이 다른 MRSA 균주에 영향을 미치는지의 시험으로서, 마우스를 일본 반코마이신-내성 MRSA 분리주 Mu50으로 시험감염시켰다(Hiramatsu et al., 1997). MRSA 분리주 USA300에 의해 관찰된 데이터와 유사하게, SpA_{KKAA} 백신접종된 동물은 모의 면역화된 동물보다 적은 Mu50 스타필로코커스를 신장 조직에 보유하고 있었다($P=0.0248$, 도 7).

[0355] **SpA-특이적 항체의 수동 전이는 스타필로코커스 질환을 예방한다.** SpA_{KKAA}는 토끼를 면역화하는데 사용했다. SpA-D_{KKAA} 또는 SpA_{KKAA}에 특이적인 토끼 항체는 동족 항원이 고정된 매트릭스 상에서 친화성 정제하여, BALB/c 마우스의 복강 내로 체중 kg당 5mg의 농도로 주사했다(표 6). 24시간 후, 특이적 항체 역가는 혈청에서 측정하고,

에스.아우레우스 뉴만을 정맥내 접종하여 동물을 시험감염 처리했다. 수동 전이는 SpA-D_{KKAA} (P=0.0016) 또는 SpA_{KKAA} (P=0.0005) 특이적 항체 시에 신장 조직내 스타필로코커스 부하량을 감소시켰다. 조직병리 검사 시에, 두 항체는 에스.아우레우스 뉴만 시험감염을 받은 마우스의 신장에서 농양 병변의 존재도를 감소시켰다(표 6). 이러한 데이터를 종합해보면, SpA-D_{KKAA} 또는 SpA_{KKAA}로 면역화 후 백신 방어는 단백질 A를 중화시키는 항체에 의해 부여되는 것으로 나타난다.

[0356]

또한, 본 발명자들은 단백질 A-특이적 항체가 치명적 시험감염에 대하여 동물을 방어할 수 있는지를 확인하고자 했다. BALB/c 마우스는 SpA_{KKAA}에 대하여 항체를 유발시키기 위해 능동 또는 수동으로 면역화시킨 다음, 치명적 용량의 에스.아우레우스 뉴만을 복강내 주사하여 시험감염시켰다(도 6). 능동 면역으로 유발되든지(P=0.0475, SpA_{KKAA} 대 모의) 또는 수동 면역으로 유발되든지(P=0.0493, SpA_{KKAA} 대 모의) 간에, SpA_{KKAA}에 대한 항체들은 에스.아우레우스 뉴만으로의 치명적 시험감염에 대하여 방어성을 부여했다(도 6).

표 5

단백질 A 백신을 이용한 마우스의 능동 면역화.

항원	신장 조직 내의 스타필로코커스 부하량 및 농양 형성				
	^a log ₁₀ CFU g ⁻¹	^b P 값	^c 감소율 (log ₁₀ CFU g ⁻¹)	^d IgG 역가	^e 농양 수
<i>에스. 아우레우스</i> 뉴만 시험감염					
모의	6.46 ± 0.25	-	-	<100	3.7 ± 1.2
SpA	3.95 ± 0.56	0.0003	2.51	1706 ± 370	2.1 ± 1.2
SpA-D	4.43 ± 0.41	0.0001	2.03	381 ± 27	1.5 ± 0.8
SpA-D _{KKAA}	3.39 ± 0.50	<0.0001	3.07	5600 ± 801	0.5 ± 0.4
<i>에스. 아우레우스</i> USA300 (LAC) 시험감염					
모의	7.20 ± 0.24	-	-	<100	4.0 ± 0.8
SpA	6.81 ± 0.26	0.2819	0.39	476 ± 60	3.3 ± 1.0
SpA-D	6.34 ± 0.52	0.1249	0.86	358 ± 19	2.2 ± 0.6
SpA-D _{KKAA}	6.00 ± 0.42	0.0189	1.20	3710 ± 1147	1.6 ± 0.6
SpA _{KKAA}	3.66 ± 0.76	0.0001	3.54	10200 ± 2476	1.2 ± 0.5

^a 면역화당 15 내지 20마리 BALB/c 마우스의 코호트에서 감염 4일 후 파쇄된 신장 조직 중의 log₁₀ CFU g⁻¹로 계산된 평균 스타필로코커스 부하량. 3가지 독립적이고 재현가능한 동물 실험의 대표를 제시했다. 평균의 표준 오차 (±SEM)도 표시했다.

[0357]

[0358]

^b 통계유의성은 평균이 루지 않은 양측 스투던츠 t-검정으로 계산하고 P 값을 기록했다; P 값 <0.05는

유의성으로 간주했다.

^c 세균 부하량의 감소는 \log_{10} CFU g⁻¹로 계산했다.

^d 5회 무작위 선택한 혈청 IgG 역가의 평균을 스타필로코커스 감염 전에 ELISA로 측정했다.

^e 동물 10마리 유래의 헤마톡실린-에오신 염색된, 박편화된 신장의 조직병리검사; 신장당 농양의 평균 수를 기록하고, 다시 평균을 내어 최종 평균 (\pm SEM)을 구했다.

표 6

단백질 A에 대한 항체를 이용한 마우스의 수동 면역화.

항체	신장 조직 중의 스태필로코커스 부하량 및 농양 형성			
	^b log ₁₀ CFU g ⁻¹	P 값	^a 감소율 (log ₁₀ CFU g ⁻¹)	^c IgG 역가
모의	7.10 ± 0.14	-	-	<100
α-SpA-D _{KKAA}	5.53 ± 0.43	0.0016	1.57	466 ± 114
α-SpA _{KKAA}	5.69 ± 0.34	0.0005	1.41	1575 ± 152

^a진화정 정제된 항체를 5 mg·kg⁻¹ 농도로 BALB/c 마우스의 복강 내로 주사한 후, 24시간 후에 1 × 10⁷ CFU 에스.

아우레우스 뉴만을 장백내 시험감염시켰다.

^b15마리 BALB/c 마우스의 코호트에서 감염 4일 후 파쇄된 신장 조직 중의 log₁₀ CFU g⁻¹

로 계산된 평균 스태필로코커스 부하량. 2가지 독립적이고 재현가능한 동물 실험의 대표를 제시했다. 평균의 표준 오차 (±SEM)도 표시했다.

^c통계유의성은 쌍을 이루지 않은 양측 스튜던츠 t-검정으로 계산하고 P 값을 기록했다; P 값 <0.05는 유의성으로 간주했다.

^d세균 부하량의 감소는 log₁₀ CFU g⁻¹로 계산했다.

^e5회 무작위 선택한 혈청 IgG 역가의 평균을 스태필로코커스 감염 전에 ELISA로 측정했다.

^f동물 10마리 유래의 헤마톡실린-에오신 염색된, 박편화된 신장의 조직병리검사; 신장당 농양의 평균 수를 기록하고, 다시 평균을 내어 최종 평균 (±SEM)을 구했다.

[0359]

[0360]

스타필로코커스 감염 또는 SpA_{KKAA} 면역화 후 단백질 A에 대한 면역 반응. 독성 에스.아우레우스 감염 후, 마우스는 동일 균주의 후속 감염에 대하여 방어 면역성을 발생시키지 않는다(Burts et al., 2008)(도 8). 이러한 동물에 SpA-D_{KKAA} 특이적 IgG의 평균 존재도는 점 불꽃에 의해 뉴만 균주 및 USA300 LAC 균주 각각에 대해 0.20 μg ml⁻¹ (±0.04) 및 0.14 μg ml⁻¹ (±0.01)로서 측정되었다(도 4). SpA_{KKAA} 또는 SpA-D_{KKAA} 백신접종된 동물에서 질환 방이에 필요한 단백질 A-특이적 IgG의 최소 농도(신장 조직 g당 P 0.05 스태필로코커스 CFU log₁₀ 감소)는 4.05 μg ml⁻¹ (±0.88)로서 계산되었다. 건강한 성인 지원자(n=16)에서 SpA-특이적 IgG의 평균 혈청 농도는 0.21 μg ml⁻¹ (±0.02)였다. 따라서, 마우스 또는 사람의 에스.아우레우스 감염은 단백질 A에 대하여 지향성인 중화 항체의 유의적인 수준을 유발시키는 면역 반응과 연관성이 없는데, 이는 이 분자의 B 세포 초항원 속성때문인 것으로 보인다. 이에 반해, 사람 지원자의 디프테리아 독소에 특이적인 IgG의 평균 혈청 농도, 0.068 μg ml⁻¹ (±0.20)는 디프테리아에 대한 방어 면역성에 필요한 범위 내였다(Behring, 1890; Lagergard et al., 1992).

[0361]

임상 에스.아우레우스 분리주는, 흡소닌-식세포 제거에 대한 회피 속성과 B 세포 초항원 활성이 스태필로코커스 농양 형성에 절대 필요한 필수 독성 인자인 단백질 A를 발현한다(Palmqvist et al., 2005; Cheng et al., 2009; Silverman and Goodyear, 2006). 따라서, 단백질 A는 방어 면역성을 위해 분자 속성이 중화되어야 하는, 발병기전에 필수적인 독소로 생각될 수 있다. Fcγ 또는 VH₃-Fab 도메인을 통해 Ig에 결합할 수 없는 비-독소발생 변이체를 만들어, 본 발명자들은 여기서 초초로 에스.아우레우스 감염에 대한 방어 면역성의 상관물로서 면역 반응을 중화시키는 단백질 A를 측정한다. 많은 메티실린-감수성 균주와 대조적으로, CA-MRSA 분리주 USA300 LAC는 훨씬 더 독성이다(Cheng et al., 2009). 예를 들어, 표면 단백질 IsdB를 이용한 실험 동물의 면역화(Kuklin et al., 2006; Stranger-Jones et al., 2006)는 에스. 아우레우스 뉴만에 대한 방어를 부여하되(Stranger-Jones et al., 2009), USA300 시험감염에 대해서는 그렇지 못한 항체를 유발시킨다.

- [0362] **재료 및 방법**
- [0363] **세균 균주 및 증식.** 스타필로코커스 아우레우스 균주 뉴만 및 USA300은 트립틱 대두 브로쓰(TSB)에서 37°C에서 증식시켰다. 에스케리키아 콜라이 균주 DH5 α 및 BL21(DE3)은 100 μg ml⁻¹ 앰피실린 첨가된 루리아-버타니(LB) 브로쓰에서 37°C에서 증식시켰다.
- [0364] **토끼 항체.** SpA의 암호화 서열은 2개의 프라이머, gctgcacatatggcgcaacacgatgaagctcaac(서열번호 35) 및 agtggatccttatgcttgagctttgtagcatctgc(서열번호 36)과 에스. 아우레우스 뉴만 주형 DNA를 사용하여 PCR-증폭시켰다. SpA-D는 2개의 프라이머 aacatatgttcaacaagatcaacaaagc(서열번호 38) 및 aaggatccagattcgtttaatttttagc(서열번호 39)를 사용하여 PCR-증폭시켰다. SpA-D_{KKAA}의 서열은 2 세트의 프라이머, Q9K, Q10K를 위한 catatgttcaacaagataaaaaagcgcttctatgaaatc(서열번호 42) 및 gatttcatagaaggcgctttttttatctttgtgaacatatg(서열번호 43) 뿐만 아니라 D36A, D37A를 위한 cttcattcaagctttaagccgcccccaagccaagcactaac(서열번호 40) 및 gtttagtgctttggcttggggcgctttaagactttgaatgaag(서열번호 41)로 돌연변이시켰다. SpA_{KKAA}는 인테그레이티드 DNA 테크놀로지스, 인크.(Integrated DNA Technologies, Inc.)에서 합성했다. PCR 산물은 pET-15b에 클로닝하여 N-말단 His₆ 태그화된 재조합 단백질을 수득했다. 플라스미드로 BL21(DE3)을 형질전환시켰다. 형질전환체의 밤샘 배양물을 새 배지에 1:100으로 희석하고 OD₆₀₀ 0.5까지 37°C에서 증식시키고, 이 때 배양물을 1mM 이소프로필 β-D-1-티오갈락토피라노사이드(IPTG)로 유도한 뒤, 추가 3시간 동안 증식시켰다. 세균 세포를 원심분리로 침전시키고, 컬럼 완충액(50mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM NaCl)에 현탁시키고, 프렌치 압력 셀로 14,000 psi로 파괴시켰다. 용해물은 막과 불용성 성분을 40,000xg로 초원심분리하여 제거했다. 가용성 용해물 중의 단백질은 니켈-니트릴로트리아세트산(Ni-NTA, Qiagen) 친화성 크로마토그래피로 처리했다. 단백질은 연속해서 높아지는 농도의 이미다졸(100-500mM)을 함유하는 컬럼 완충액으로 용출시켰다. 단백질 농도는 비신콘산(BCA) 분석법(Thermo Scientific)으로 측정했다. 항체 생산을 위해, 토끼(6개월령의 뉴질랜드 백색, 암컷, 찰스 리버 래보레이토리즈)는 완전 프로인트 보강제(Difco)에 유화된 500 μg 단백질을 견갑하 주사하여 면역화시켰다. 추가 면역화를 위해, 불완전 프로인트 보강제에 유화된 단백질을 1차 면역화 후 24일 또는 48일 후에 주사했다. 60일째, 토끼의 혈액을 뽑아 혈청을 회수했다.
- [0365] **항체 분리.** 정제된 항체(5mg 단백질)는 HiTrap NHS-활성화된 HP 컬럼(GE Healthcare)에 공유 결합시켰다. 항원-매트릭스는 4°C에서 10-20ml 토끼 혈청의 친화성 크로마토그래피에 사용했다. 주입된 매트릭스는 50 컬럼 용적의 PBS로 세척하고, 항체를 용출 완충액(1M 글리신, pH 2.5, 0.5M NaCl)으로 용출시키고, 1M Tris-HCl, pH 8.5로 즉시 중화시켰다. 정제된 항체는 PBS에 대해 4°C에서 밤새 투석했다.
- [0366] **F(ab)₂ 단편.** 친화성 정제된 항체는 37°C에서 30분 동안 펩신 3mg과 혼합했다. 1M Tris-HCl, pH 8.5로 반응을 정지시키고, F(ab)₂ 단편을 특이적 항원-접합된 HiTrap NHS-활성화된 HP 컬럼으로 친화성 정제했다. 정제된 항체는 4°C에서 PBS에 대하여 밤새 투석하고, SDS-PAGE 겔에 로딩한 뒤, 쿠마시 블루 염색으로 가시화했다.
- [0367] **능동 및 수동 면역화.** BALB/c 마우스(3주령, 암컷, 찰스 리버 래보레이토리즈)는 완전 프로인트 보강제(Difco)에 유화된 50 μg 단백질로 근육내 주사에 의해 면역화시켰다. 추가 면역화를 위해, 단백질을 불완전 프로인트 보강제에 유화시키고, 1차 면역화 후 11일 후에 주사했다. 면역화 후 20일째, 5마리 마우스의 혈액을 뽑아 효소 면역분석법(ELISA)에 의한 특이적 항체 역가를 위한 혈청을 수득했다.
- [0368] BALB/c 마우스는 근육내 주사로 면역화하고, 11일 및 25일 후 명반 중의 동일 항원으로 추가 면역화시켰다. 34일째, 마우스의 혈액을 채취해 특이적 항체 역가를 위한 혈청을 수득했다. 친화성 정제된 항체는 준치명적 시험 감염, 또는 치명적 시험감염 전, 각각 24시간 또는 4시간 전에 BALB/c 마우스의 복강 내로 주사했다. 동물 혈액은 안와주위 정맥 천공을 통해 수집하고 항원 특이적 혈청 항체 역가를 ELISA로 측정했다.
- [0369] **마우스 신장 농양.** 에스. 아우레우스 뉴만 또는 USA300(LAC)의 밤샘 배양물을 새 TSB에 1:100으로 희석하고 37°C에서 2시간 동안 증식시켰다. 스타필로코커스를 침전시키고, PBS로 세척하고 OD₆₀₀ 0.4(약 1 x 10⁸ CFU ml⁻¹)로 현탁시켰다. 접종물은 샘플 분취량을 TSA에 도달하여 정량하고 형성된 콜로니를 계수했다. BALB/c 마우스(6주령, 암컷, 찰스 리버 래보레이토리즈)는 체중 1kg당 케타민 100mg ml⁻¹ 및 자일라진 20mg ml⁻¹을 복강

내 주사를 통해 마취했다. 마우스는 에스. 아우레우스 뉴만 1×10^7 CFU 또는 에스. 아우레우스 USA300 5×10^6 CFU 를 안와후방 주사하여 감염시켰다. 시험감염 4일째, 마우스는 CO₂ 흡입으로 사망시켰다. 양쪽 신장을 분리하고 한 기관 중의 스타필로코커스 부하량을, 신장 조직을 PBS, 1% Triton X-100으로 파쇄하여 분석했다. 파쇄액의 연속 희석물을 TSA 위에 도말하고 항온배양하여 콜로니 형성시켰다. 나머지 기관은 조직병리 검사했다. 간략히 설명하면, 신장은 10% 포르말린에 실온에서 24시간 동안 고정시켰다. 조직을 파라핀에 포매시키고 박편화한 뒤, 헤마톡실린-에오신으로 염색하고 광학 현미경으로 조사하여 농양 병변을 계수했다. 모든 마우스 실험은 IBC(Institutional Biosafety Committee) 및 시카고 대학의 IACUC(Institutional Animal Care and Use Committee)의 실험 프로토콜 검토와 승인을 따르는 제도적 지침서에 따라 수행했다.

[0370] **마우스 감염.** 스타필로코커스는 마취된 마우스를 안와후방 주사(1×10^7 CFU의 에스.아우레우스 뉴만, 5×10^6 CFU의 에스. 아우레우스 USA300 또는 3×10^7 CFU의 에스. 아우레우스 Mu50)를 통해 감염시키는데 사용했다. 4일, 15일 또는 30일째, 마우스를 사망시키고, 신장을 분리한 뒤, 파쇄한 조직을 한천 위에 도말하여 콜로니를 형성시켰다. 또한, 기관 조직을 박편화하고, 헤마톡실린-에오신으로 염색하고 검경법으로 관찰했다. 동물 실험은 IBC(Institutional Biosafety Committee) 및 시카고 대학의 IACUC(Institutional Animal Care and Use Committee)의 실험 프로토콜 검토와 승인을 따르는 제도적 지침서에 따라 수행했다.

[0371] 치명적 시험감염 실험을 위해, BALB/c 마우스(실험당 8 내지 10마리 동물의 코호트)를 $2-6 \times 10^8$ CFU의 에스.아우레우스 뉴만 또는 이의 동질유전자형 Δspa 변이체의 현탁액으로 복강내로 주사했다. 동물 생존을 13일의 기간에 걸쳐 모니터링하고 생존 데이터의 통계적 유의성을 로그-랭크 검정으로 분석했다.

[0372] **단백질 A 결합.** 사람 IgG 결합을 위해, Ni-NTA 친화성 컬럼에는 컬럼 완충액 중의 정제된 단백질(SpA, SpA-D, SpA-D_{KKAA} 및 SrtA) 200 μg 을 예비충전했다. 세척 후, 사람 IgG(Sigma) 200 μg 을 컬럼 위에 로딩했다. 단백질 샘플은 세척물과 용출물로부터 수집하고, SDS-PAGE 겔 전기영동으로 처리한 다음, 쿠마시 블루 염색시켰다. 정제된 단백질(SpA, SpA_{KKAA}, SpA-D 및 SpA-D_{KKAA})을 0.1M 탄산염 완충액(pH 9.5)에서 $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ 농도로 4°C에서 밤새 MaxiSorp ELISA 플레이트(NUNC) 위에 코팅했다. 플레이트는 그 다음 5% 전유로 차단한 뒤, 피옥시다제-접합된 사람 IgG, Fc 또는 F(ab)₂ 단편의 연속 희석물과 1시간 동안 항온처리했다. 플레이트는 세척하고 OptEIA ELISA 시약(BD)을 사용하여 발색시켰다. 반응은 1M 인산으로 반응정지시키고, A₄₅₀ 판독값을 사용하여 1/2 최대 역가 및 결합률%을 계산했다.

[0373] **폰 빌레브란트 인자(vWF) 결합 분석.** 정제된 단백질(SpA, SpA_{KKAA}, SpA D 및 SpA-D_{KKAA})은 전술한 바와 같이 코팅 및 차단했다. 플레이트는 사람 vWF로 $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ 농도로 2 시간 동안 항온처리한 뒤, 세척하고 사람 IgG으로 추가 시간 동안 차단했다. 세척 후, 플레이트는 사람 vWF에 대해 지향성인 피옥시다제-접합된 항체의 연속 희석물로 1시간 동안 항온처리했다. 플레이트를 세척하고 OptEIA ELISA 시약(BD)을 사용하여 발색시켰다. 반응물은 1M 인산으로 급냉시키고 A₄₅₀ 판독값을 사용하여 1/2 최대 역가 및 결합률%을 계산했다. 역제 분석을 위해, 플레이트를 SpA-D_{KKAA}에 특이적인 친화성 정제된 F(ab)₂ 단편 $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ 농도와 1시간 동안 항온처리한 뒤, 리간드 결합 분석했다.

[0374] **비장세포 아포토시스.** 친화성 정제된 단백질(150 μg SpA, SpA-D, SpA_{KKAA} 및 SpA-D_{KKAA})은 BALB/c 마우스(6주령, 암컷, 찰스 리버 래보레이토리즈)의 복강 내로 주사했다. 주사 4시간 후, 동물을 CO₂ 흡입으로 사망시켰다. 이들의 비장을 분리하고 파쇄했다. 세포 여과기를 사용하여 세포 찌꺼기를 제거하고 현탁된 세포를 ACK 용해 완충액(0.15M NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 0.1mM EDTA)으로 옮겨 적혈구 세포를 용해시켰다. 백혈구 세포는 원심분리로 침전시키고, PBS에 현탁시킨 뒤, 얼음 위 1:250 희석된 R-PE 접합된 항-CD19 모노클로날 항체(Invitrogen)와 암실에서 1시간 동안 염색했다. 세포를 1% FBS로 세척하고 4% 포르말린으로 밤새 4°C에서 고정시켰다. 다음 날, 세포를 PBS로 희석하고 유동세포분석법으로 분석했다. 남은 기관은 조직병리에 대해 검사했다. 간략히 설명하면, 비장을 10% 포르말린에 24시간 동안 실온에서 고정시켰다. 조직을 파라핀에 포매시키고 박편화한 뒤, 아포토시스 검출 키트(Millipore)로 염색하고 광학 현미경으로 조사했다.

[0375] **항체 정량.** 혈청은 에스. 아우레우스 뉴만 또는 USA300으로 30일 동안 감염시키거나, 전술한 바와 같이 SpA-

D_{KKAA}/SpA_{KKAA}으로 면역화시킨 BALB/c 마우스 또는 건강한 사람 지원자로부터 수집했다. 사람/마우스 IgG(Jackson Immunology Laboratory), SpA_{KKAA}, 및 CRM₁₉₇을 니트로셀룰로스 막 위에 블로팅했다. 막은 5% 전유로 차단한 뒤, 사람 또는 마우스 혈청과 항온처리했다. IRDye 700DX 접합된 친화성 정제된 항-사람/마우스 IgG(Rockland)는 Odyssey™ 적외선 조영 시스템(Li-cor)을 사용하여 시그널 강도를 정량분석하는데 사용했다. 사람 지원자의 혈액을 이용한 실험은 시카고 대학의 IRB(Institutional Review Board)의 규제 감독 하에 검토, 승인 및 수행되는 프로토콜을 수반했다.

[0376] **통계 분석.** 신장 농양, ELISA, 및 B 세포 초항원 데이터의 통계 유의성을 분석하기 위해 양측 스튜던츠 t 검정을 수행했다. 동물 생존 데이터는 log-순위 검사(Prism)로 분석했다.

[0377] **실시예 3**

[0378] **스타필로코커스 아우레우스의 코아글라제는 농양 형성에 기여하고 방어 항원으로서 작용한다.**

[0379] 모든 임상 에스. 아우레우스 분리주는 코아글라제 활성, 즉 피브리노겐을 절단하는 프로트롬빈의 비-단백분해 활성화를 통한 혈액 또는 혈장의 응고를 나타낸다. 본 발명자들은 프로트롬빈, 피브리노겐, 코아글라제(Coa) 및 폰 빌레브란트-인자 결합 단백질(vWbp)을 감염된 마우스의 스태필로코커스 농양 병변에서 확인했다. 분비된 Coa 및 vWbp는 둘다 에스. 아우레우스 뉴만 코아글라제 활성에 기여했고, 농양 형성뿐만 아니라 마우스의 치명적 질환을 가능하게 했다. 정제된 Coa 또는 vWbp에 대해 유발된 항체는 대응하는 폴리펩타이드와 프로트롬빈 및 피브리노겐의 결합을 특이적으로 차단한다. Coa- 및 vWbp-특이적 항체는 능동 또는 수동 면역화에 의한 유발 여부에 관계없이, 스태필로코커스 감염된 마우스의 사망률 및 농양 형성을 예방했다.

[0380] **VIII. 결과**

[0381] **스타필로코커스의 농양에서 코아글라제 및 응고인자의 국제화.** 종래 연구는 마우스의 신장 농양 모델을 확립했고, 이로써 1×10^7 CFU의 사람 임상 분리주 에스. 아우레우스 뉴만(Baba et al., 2007)을 BALB/c 마우스의 혈류로 주사했다(Albus et al., 1991). 감염 48시간 후, 마우스는 초기 몇몇 세균에 의한 다형핵성 백혈구(PMN)의 축적으로서 헤마톡실린-에오신 염색된, 박편화된 신장 조직의 광학 검경법으로 검출할 수 있는, 범발성 농양을 다수의 기관에서 발생시킨다(Cheng et al., 2009). 감염 5일경, 농양은 크기가 증가하고 호산구성 무정형 물질(가성협막) 층과 큰 PMN 커프로 둘러싸인 스태필로코커스의 중심 집단(스타필로코커스 농양 공동체-SAC)을 포위한다(Cheng et al., 2009). 조직병리 검사는 건강한 식세포 외투층뿐 아니라 농양 병변의 중심에서 스태필로코커스 병터에 근접하게 PMN의 집단 피사를 나타낸다. 이후 시간 간격마다, SAC는 증가하고 농양이 파열하여, 피사 물질과 스태필로코커스를 혈류 내로 방출시킨다. 새로운 농양 형성 라운드가 시작되어, 사실상 감염의 치명적 결과를 촉진시킨다(Cheng et al., 2009).

[0382] 농양 병변의 코아글라제를 국제화하기 위해, 에스. 아우레우스 뉴만으로 5일 동안 감염시킨 마우스의 신장을 박편화하고 친화성 정제된 Coa- 또는 vWbp-특이적 토끼 항체를 이용한 면역-조직화학으로 염색했다(도 10). 본 발명자들은 SAC를 둘러싼 가성협막 및 농양 병변의 주변, 즉 미감염 조직과 경계를 이루는 피브린 협막에서 강한 Coa 염색을 관찰했다. vWbp 염색은 농양 병변 전반에서 나타났지만, 주변에 축적을 나타냈다. 프로트롬빈 특이적 항체는 가성협막 및 주변부에 존재하는 자이모겐의 염색을 나타낸 반면, 피브리노겐/피브린 특이적 염색은 농양 병변 전반에서 나타났다. 종합하면, 이 데이터들은 스태필로코커스 농양의 호산구성 가성협막이 Coa와 공동국제화하는 프로트롬빈 및 피브리노겐을 수용한다는 것을 시사한다. 농양 병변의 주변부에는 Coa, vWbp, 프로트롬빈 및 피브리노겐/피브린이 공동국제화한다. 이러한 관찰들은 피브리노겐의 피브린으로의 프로트롬빈-매개 변환을 자극하여 Coa 및 vWbp가 농양 확립에 중요한 기여인자인지에 관한 추가 연구를 촉구했다.

[0383] **스타필로코커스 아우레우스 coa 및 vWbp는 마우스 혈액의 응고에 기여한다.** 에스. 아우레우스 뉴만의 염색체에 존재하는 *coa* 및/또는 *vWbp* 유전자는 pKOR1 기술을 이용하여 대립유전자 치환으로 결실시켰다(Bae and Schneewind, 2005). 2개의 상보체성 플라스미드, *pcoa* 및 *pVWbp*는 *coa* 및 *vWbp* 구조 유전자뿐만 아니라 이들의 상류 프로모터 서열을 pOS1 내로 클로닝하여 작제했다(Schneewind et al., 1993). 플라스미드는 스태필로코커스 내로 전기천공시키고, 이들의 지속적인 복제는 클로람페니콜이 보충된 배지에서 선택했다(Schneewind et al., 1992). 코아글라제를 특이적 항체로 탐침했을 때, 본 발명자들은 야생형뿐 아니라 Δ vWbp 균주에 의한 Coa 분비를 관찰했으나, Δ coa 또는 Δ coa/ Δ vWbp 변이체에 의한 분비는 관찰하지 못했다(도 11). Δ coa 및 Δ coa/ Δ

vWbp 돌연변이체의 표현형 결핍은 *pcoa*를 사용한 전기천공에 의해 복원되지만, *pvWbp*에 의해서는 복원되지 않았다. 이와 마찬가지로, *vWbp*의 분비는 에스. 아우레우스 뉴만(야생형)뿐 아니라 Δcoa 돌연변이 배양물에서는 관찰되지만, $\Delta vWbp$ 또는 $\Delta coa/\Delta vWbp$ 변이체에서는 관찰되지 않았다(도 11). 이러한 결함은 *pvWbp*의 전기천공에 의해 복원되지만, *pcoa*에 의해서는 복원되지 않았다.

[0384] 혈액 응고는 트롬빈과 1:1 복합체를 형성하는 거머리 65 잔기 펩타이드인 히루딘(레피루딘)(Harvey et al., 1986)에 의해 효과적으로 억제되어, 피브리노겐의 피브린으로의 단백질해성 변환을 차단한다(Markwardt, 1955). 새로운 레피루딘-처리된 마우스 혈액에 에스. 아우레우스 뉴만 접종은 응고를 12시간 이내로 촉진한 반면, 모의 감염된 혈액은 48시간 이상 동안 응고없이 유지되었다(도 11C). 이 분석법을 사용하여, 코아글라제 활성이 부족한 스타필로코커스 변이체는 응고 시간을 지연시켜, Δcoa 는 36시간, $\Delta vWbp$ 는 24시간으로 지연시켰다(도 11C). 이중 돌연변이체, $\Delta coa/\Delta vWbp$ 는 마우스 혈액을 응고시킬 수 없었다. 이러한 결함은 플라스미드 *pvWbp* 뿐만 아니라 *pcoa*의 전기천공에 의해 보충되었다. 이를 종합해보면, 이 데이터들은 두 코아글라제, Coa 및 *vWbp*가 에스. 아우레우스 뉴만의 마우스 혈액 응고 능력에 기여한다는 것을 시사한다(도 11C).

[0385] Coa 및 *vWbp*는 혈액에서 스타필로코커스 생존, 농양 형성 및 마우스의 치명적 균혈증에 필요하다. 코아글라제의 독성 기여도를 분석하기 위해, 본 발명자들은 먼저 레피루딘-처리된 혈액에서 스타필로코커스 생존율을 조사했다. 야생형 균주 에스. 아우레우스 뉴만은 마우스 혈액에서 사멸되지 않았지만, Coa가 결여된 동종 변이체, 즉 Δcoa 및 $\Delta coa/\Delta vWbp$ 는 각각 30분 항온처리 후 CFU의 유의적인 감소를 나타냈다. 이러한 생존율의 결함은 *pvWbp*가 아닌 *pcoa*에 의해 복원되었고, 이는 Coa만이 마우스 혈액에서 스타필로코커스 생존율에 필요하다는 것을 시사한다.

[0386] 스타필로코커스 균혈증은 병원 환경에서 사람 사망률의 빈번한 원인이다(Klebens et al., 2007). 본 발명자들은 1×10^8 CFU 에스. 아우레우스 뉴만의 정맥내 주사 후에 코아글라제가 BALB/c 마우스의 치명적 시험감염에 필요한지를 확인하고자 했다. 야생형 모 균주 뉴만으로 감염된 모든 동물은 24시간 이내에 감염으로 사망했다(도 12B). 단일 돌연변이체, Δcoa 또는 $\Delta vWbp$ 로 감염된 동물은 각각 짧지만, 사망까지의 시간을 통계적 유의성 있게 지연시켰다(도 12B). 이중 돌연변이 균주는 단일 결실을 보유한 돌연변이체보다 훨씬 더 손상되었고, $\Delta coa/\Delta vWbp$ 균주로 감염된 동물은 야생형과 비교했을 때 가장 큰 독성 감소를 나타냈다(도 12B).

[0387] 다음으로 본 발명자들은 감염된 마우스의 신장 조직에서 농양 형성을 분석했고, Δcoa 변이체가 감염 5일 및 15일경에 농양을 형성하는 능력이 손상된 것으로 관찰되었다(표 7, 도 12G, 12I). $\Delta vWbp$ 돌연변이체는 농양 형성을 지속했지만, 세균 부하량, 스타필로코커스 농양 공동체의 전체 크기 및 면역 세포 침윤물의 양은 이들 변이체에서 감소했다(표 7, 도 12D, 12F). 코아글라제의 돌연변이체는 Δcoa 가 15일경 더 낮은 농양 형성 및 세균 부하량을 보유하고 있는 바, *vWbp*에서보다 약간더 약독화된 독성을 나타낸다. 하지만, $\Delta coa/\Delta vWbp$ 이중 돌연변이체는 농양을 형성하고 감염된 조직에 존속하는 능력이 현저하게 무능력해졌다(표 7, 도 12H, 12K). 따라서, 코아글라제 및 폰 빌레브란트 인자 결합 단백질은 혈류에서든지 또는 말단 기관 조직에서든지 간에, 숙주에서 스타필로코커스 생존율에 중요하다.

표 7

에스. 아우레우스 뉴만 *coa*, *vWbp*, 및 *coa/vWbp* 돌연변이체의 특성

균주	신장 조직 중의 스타필로코커스 부하량*		신장 조직 중의 농양 형성*		유의성 (P 값)
	\log_{10} CFU g ⁻¹	표면 농양 (%)	\log_{10} CFU g ⁻¹	신장당 농양 수	
스타필로코커스 부하량 및 농양 형성의 5일 분석					
PBS	6.034 ± 0.899	75	—	2.333 ± 0.623	—
<i>Coa</i>	5.538 ± 0.560	38	0.492	1.111 ± 0.389	0.1635
<i>vWbp</i>	5.247 ± 0.311	56	0.783	1.750 ± 0.650	0.6085
<i>coa/vWbp</i>	4.908 ± 0.251	25	1.395	0.750 ± 0.342	0.0786
스타필로코커스 부하량 및 농양 형성의 15일 분석					
PBS	5.380 ± 0.294	81	—	3.000 ± 1.234	—
<i>Coa</i>	4.023 ± 0.324	44	1.357	1.400 ± 0.452	0.1862
<i>vWbp</i>	5.140 ± 0.689	50	0.240	1.625 ± 0.298	0.2974
<i>coa/vWbp</i>	3.300 ± 0.552	20	2.080	0.556 ± 0.154	0.0341

*BALB/c 마우스 (n=18-20)에게 0일째 *vWbp* (α -*vWbp*), *Coa* (α -*Coa*) 또는 *vWbp* 및 *Coa* (α -*vWbp/Coa*)에 대한 친화성 정제된 표기 항체를 각각 100 μ l 적 복강 내로 주사했다. 24시간 후, 동물을 멸종 중의 IgG 항체 여가에 대해 조사하고, 1×10⁷ 콜로니 형성 단위 (CFU)의 에스. 아우레우스 뉴만 또는 이의 돌연변이체를 정맥내 접종하여 시험감염시켰다. 5일 또는 15일 후, 동물을 사형시키고, 양측 신장을 분리했다. 한쪽 신장을 포름알데하이드에 고정시키고, 파라핀에 포매시킨 뒤, 박편화하고, 헤마톡실린-에오신 염색한 뒤, 신장당 4개의 시상면을 농양 형성에 대해 분석했다. 다른 신장은 PBS 완충액에서 파쇄하고, 파쇄액을 한천 배지 위에 도말하여 콜로니 형성시키고, 스타필로코커스 부하량을 CFU로서 계수했다.

*면역화당 18 내지 20마리 BALB/c 마우스의 코호트에서 감염 4일 후 파쇄된 신장 조직 중의 \log_{10} CFU g⁻¹로 계산된 스타필로코커스 부하량의 평균. 평균의 표준 오차 (\pm SEM)도 표시했다.

*통계유의성은 생을 이루지 않은 양측 스투던츠 t-검정으로 계산하고 P 값을 기록했다; P 값 <0.05는 유의성으로 간주했다.

^c 세균 부하량의 감소는 \log_{10} CFU g⁻¹로 계산했다.

*감염 4일 후 신장 조직 중의 농양 형성은 육안 조사로 측정했다(양성%).

*동물 10마리 유래의 헤마톡실린-에오신 염색된, 박편화된 신장의 조직병리검사; 신장당 농양의 평균 수를 기록하고, 다시 평균을 내어 최종 평균 (\pm SEM)을 구했다.

*통계유의성은 생을 이루지 않은 양측 스투던츠 t-검정으로 계산하고 P 값을 기록했다; P 값 <0.05는 유의성으로 간주했다.

[0388]

[0389]

코아글라제에 대한 항체 및 스타필로코커스 감염 동안 유도된 혈액 응고에 미치는 이들의 효과. 제조합 His₆-*Coa* 및 His₆-*vWbp*는 Ni-NTA에서 친화성 크로마토그래피로 정제하고(도 13A), 보강제에 유화시킨 뒤, 토끼에게 주사하여 특이적 항체를 유발시키고, 이 항체는 제조합 단백질을 보유한 친화성 매트릭스 상에서 정제했다. *Coa*에 대해 지향성인 항체는 *vWbp*가 아닌 *Coa*에 우선적으로 결합했다(도 13B). *vWbp*에 대해 지향성인 항체는 반대였다(도 13B). 에스. 아우레우스 뉴만으로 감염된 레피루딘-처리된 마우스 혈액에 첨가했을 때, 본 발명자들은 *Coa*, *vWbp* 또는 *Coa* 및 *vWbp*에 대해 지향성인 항체가 각각 혈액 응고를 차단한다는 것을 관찰했다(도 13C). 대조군으로서, 모의 처리된 샘플 또는 무관한 V10 항체(에르시니아 페스티스 타입 III 주사에 대해 방어를 제공한다(DeBord et al., 2006))는 어떠한 효과도 없었다(도 13C).

[0390]

분리된 *Coa* 또는 *vWbp*에 미치는 항체의 역할을 조사하기 위해, 본 발명자들은 제조합된 기능성 활성 단백질을 정제했고(Friedrich et al., 2003), 그 다음 레피루딘 처리된 마우스 혈액에 첨가했다. *Coa* 또는 *vWbp* 처리된 마우스 혈액은 30분 이내에 응고했다(도 13D). 대조군으로서, 모의(PBS) 또는 무관한 V10 항체 처리는 혈액응고에 영향을 미치지 않았다. *Coa* 또는 *vWbp*에 대해 유도된 항체는 제조합 단백질로 처리된 마우스 혈액의 응고를 지연시켰고, 이는 심지어 교차-반응성 상동성 인자에서도 나타났다(도 13D). 항체의 최소 교차반응성은 ELISA 및 웨스턴 블롯에 의해 관찰되었으나, 교차 억제 기능도 있다.

[0391]

코아글라제와 프로트롬빈 또는 피브리노겐 간의 결합을 차단하는 항체. 표면 플라즈몬 공명(SPR)은 α *Coa* 및 α *vWbp* 항체가 어떻게 코아글라제의 생리적 기능을 방해하는지를 조사하기 위해 사용했다. 프로트롬빈을 CM5 칩 위에 고정시켰다. 정제된 *Coa*를 샘플 위로 유도시키면, 해리 상수 K_D는 28 nM로 계산되었고, 이 값은 다른 문헌의 보고와 비슷했다(Friedrich et al., 2003). α *Coa*의 첨가는 프로트롬빈·*Coa*의 형성의 반응 시그널을 농도-의존적으로 감소시켰고, 이는 이 항체들이 프로트롬빈과 *Coa*의 결합을 차단한다는 것을 시사한다(도 14A). SPR

은 또한 코아글라제와 피브리노겐 간의 결합도 확인해주었다(K_D 93.1 nM, 도 14B). α Coa와의 예비항온처리 시, 본 발명자들은 피브리노겐에 대한 Coa의 결합에 있어서 급격한 감소를 관찰했다(도 14B). 이를 종합하면, 이 결과들은 Coa에 대해 유발된 항체가 이 분자와 혈액 응고인자의 결합을 차단한다는 것을 시사한다.

[0392] 정제된 vWbp는 프로트롬빈(K_D 38.4nM, 도 13C) 및 피브리노겐(484nM, 도 13D)에 대해 강한 친화성을 나타냈고, 이 후자에 대해서는 지금까지 인식된 적이 없다(Kroh et al., 2009). 또한, vWbp에 대해 유발된 항체와의 예비항온처리는 vWbp와 프로트롬빈 또는 피브리노겐 간에 결합을 용량 의존적 방식으로 차단했다(도 13C, 13D). 이러한 발견은 혈액 응고 분석의 결과를 지지하는 것으로, 특정 폴리클로날 항체가 Coa 또는 vWbp와 응고 캐스케이드의 특정 성분 간에 상호작용을 차단할 수 있다는 것을 입증한다(도 12).

[0393] 코아글라제에 특이적인 항체가 피브리노겐의 피브린으로의 변환을 차단하는지를 시험하기 위해, 피브리노겐의 피브린으로의 절단에 대한 대행자로서, S-2238을 절단하는 프로트롬빈·코아글라제 복합체의 능력을 측정했다(도 14E, 14F). 프로트롬빈·Coa 또는 프로트롬빈·vWbp에 특정 항체의 첨가는 기질을 산물로 변환시키는 상기 복합체들의 능력을 감소시켰다. 또한, 코아글라제-특이적 항체의 교차 억제에 관찰되었고, 여기서 교차반응성 항체의 첨가는 프로트롬빈·vWbp 복합체의 활성을 감소시켰다. 이 데이터들은 Coa 또는 vWbp에 대해 유도된 특정 항체가 이들이 결합하는 분비된 산물의 병태생리학적 효과를 증하시킨다는 것을 시사한다.

[0394] **코아글라제에 대한 항체는 스타필로코커스 질환에 대한 방어를 제공한다.** Coa 또는 vWbp에 특이적인 IgG형 항체는, CNBr 세파로스에 항원을 공유 가교시켜 만든 친화성 컬럼 크로마토그래피에 의해 토끼 혈청으로부터 분리했다. 본 발명자들은 Coa 및/또는 vWbp에 대해 지향성인 중화 항체를 투여하여 스타필로코커스 발병기전을 교란시키고자 했다. 마우스에게 토끼 항체를 투여하고, 치명적 용량의 에스. 아우레우스 균주 뉴만으로 시험감염시켰다. Coa 또는 vWbp 특이적 항체의 주사는 쥐의 생존을 유의적으로 연장시켰다(도 15).

[0395] 치명적 균혈증에 대해 백신 방어가 가능한 항체 시약을 시험하기 위해, 친화성 정제된 IgG(5mg kg^{-1} 체중)을 마우스의 복강 내로 주사했다. 24시간 후, 동물에게 PBS 중의 1×10^8 CFU 에스.아우레우스 뉴만 현탁액을 안와후방 열기 내로 주사했다. 동물을 경시적으로 모니터링하여, 본 발명자들은 vWbp(α vWbp)에 대해 유도된 항체가, 무관련 α V10 항체를 투여받고 12 내지 48시간 내에 사망한 동물과 비교했을 때 사망까지의 시간을 증가시키고 10% 생존율을 초래했다(도 15). Coa에 대한 항체(α Coa)는 또한 수동 면역화된 마우스의 사망까지의 시간을 증가시켰다(도 15). 두 항체의 혼합물(α Coa/ α vWbp)은 α Coa 항체에 비해 생존율 또는 사망까지의 시간에 있어서 통계적으로 유의적인 향상을 초래하지 않았다.

[0396] 스타필로코커스의 농양 형성에 대한 방어를 위한 수동 면역을 조사하기 위해, 정제된 항체(5mg kg^{-1} 체중)를 마우스의 복강 내로 주사하고, 농양 형성을 1×10^7 CFU 에스.아우레우스 뉴만의 정맥내 시험감염 후에 5일 동안 모니터링했다. vWbp에 대한 항체는 스타필로코커스 부하량 또는 염증 병변의 수에 있어서 유의적인 감소를 초래하지 않았고(표 8), 관찰된 병변들은 모의 면역화된 마우스에 비해 크기가 작은 농양 공동체를 보유하고, 감소된 PMN 침윤물을 나타냈다(도 16). 코아글라제에 대한 항체는 염증성 병변의 수($P=0.039$)뿐만 아니라 스타필로코커스 부하량을 감소시켰고($P=0.042$); 큰 PMN 침윤물의 병변에서 스타필로코커스 공동체를 보유한 농양 병변은 검출되지 않았다(도 16 및 표 8). 두 항체, α vWbp 및 α Coa를 투여받은 동물은 스타필로코커스 부하량의 더 큰 감소($P=0.013$) 및 염증성 병변 존재도의 감소($P=0.0078$)를 나타냈다(표 8). 이를 종합하면, 이 데이터들은 수동 면역화에 의해 투여된 코아글라제에 대한 항체가 농양 형성에 대해 마우스를 방어하고 침입 병원균을 숙주 조직으로부터 제거시킬 수 있다는 것을 시사한다. vWbp에 대한 항체는 백신 방어에 비교적 거의 기여하지 않는데, 이는 vWbp가 마우스에서 에스. 아우레우스 감염의 발병기전 동안 Coa만큼 중요한 역할을 하지 않는다는 발견과 일치한다(표 8).

표 8

Coa 및/또는 vWbp에 대한 토끼 항체를 이용한 마우스의 수동 면역화

정제된 토끼 항체	신장 조직 중의 스태필로코커스 부하량*			신장 조직 중의 농양 형성*		
	^a 신장 조직의 log ₁₀ CFU g ⁻¹	^b 유의성 (P 값)	^c log ₁₀ CFU 감소율	^d 표면 농양 (%)	^e 신장 농양 수	^f 유의성 (P 값)
모의	5.86 ± 0.29	-	-	75	4.6 ± 1.4	-
α-vWbp	5.25 ± 0.36	0.3554	0.60	39	1.4 ± 0.5	0.0592
α-Coa	4.68 ± 0.47	0.0420	1.18	20	1.2 ± 0.7	0.0396
α-vWbp/Coa	4.29 ± 0.52	0.0130	1.53	25	0.3 ± 0.2	0.0078

*BALB/c 마우스 (n=18-20)에게 0일째 vWbp (α-vWbp), Coa (α-Coa) 또는 vWbp 및 Coa (α-vWbp/Coa)에 대한 친화성 정제된 토끼 항체를 각각 100 μl씩 복강 내로 주사했다. 24시간 후, 동물을 혈청 중의 IgG 항체 역가에 대해 조사하고, 1×10⁷ 콜로니 형성 단위 (CFU)의 에스.아우레우스 뉴만을 정맥내 접종하여 시험감염시켰다. 5일 후, 동물을 사망시키고, 양쪽 신장을 분리했다. 한쪽 신장을 포름알데하이드에 고정시키고, 파단된 포메시킨 뒤, 박편화하고, 헤마톡실린-에오신 염색한 뒤, 신장당 4개의 사상면을 농양 형성에 대해 분석했다. 다른 신장은 PBS 완충액에서 파쇄하고, 파쇄액을 한천 배지 위에 도말하여 콜로니 형성시키고, 스태필로코커스 부하량을 CFU로서 계수했다.

^a면역화 18 내지 20마리 BALB/c 마우스의 코호트에서 감염 4일 후 파쇄된 신장 조직 중의 log₁₀ CFU g⁻¹로 계산된 스태필로코커스 부하량의 평균. 평균의 표준 오차 (±SEM)도 표시했다.

^b통계유의성은 쌍을 이루지 않은 양측 스튜던츠 t-검정으로 계산하고 P 값을 기록했다; P 값 <0.05는 유의성으로 간주했다.

^c세균 부하량의 감소는 log₁₀ CFU g⁻¹로 계산했다.

^d감염 4일 후 신장 조직 중의 농양 형성은 육안 조사로 측정했다(양성%).

^e동물 10마리 유래의 헤마톡실린-에오신 염색된, 박편화된 신장의 조직병리검사; 신장 농양의 평균 수를 기록하고, 다시 평균을 내어 최종 평균 (±SEM)을 구했다.

^f통계유의성은 쌍을 이루지 않은 양측 스튜던츠 t-검정으로 계산하고 P 값을 기록했다; P 값 <0.05는 유의성으로 간주했다.

[0397]

[0398]

코아골라제는 스태필로코커스 감염의 방어 항원으로서 작용한다. 폴리-히스티딘 태그화된 CoA 및 vWbp는 이.콜라이로부터 정제했고, 서브유닛 백신 항원으로서 사용했다. 단백질(CFA 또는 IFA에 유화된 100μg)은 0일(CFA) 또는 11일(IFA)째에 시험처리되지 않은 BALB/c 마우스에 주사했다. 21일째, 에스.아우레우스 뉴만의 정맥내 접종으로 동물에게 시험감염시켰다. 5마리 대조용 동물은 시험감염 시에 채혈하고, 백신 항원에 대한 혈청 항체 역가를 ELISA로 측정했다(표 9). 시험감염 후 5일 또는 15일째 동물을 사망시키고, 스태필로코커스 부하량 및 농양 병변의 조직병리를 분석했다. Coa로의 면역화는 5일경(P=0.03, PBS 모의군 대 Coa) 및 15일경(P=4.286x10⁻⁵, PBS 모의군 대 Coa, 표 9 참조)에 세균 부하량을 감소시켰다. 또한, Coa 백신접종은 신장 조직에 형성된 감염성 병변의 수를 감소시켰다, 모의군 대 Coa, P=0.03(5일) 및 P=0.0522(15일)(표 9). 물론, Coa-면역화된 마우스는 전형적인 농양 병변을 발생시키지 않았다(도 17). 때로, 스태필로코커스 농양 공동체와 관련이 없는 PMN의 소량 축적이 관찰되었다(도 17). vWbp로의 면역화는 5일째(P=0.39, PBS 모의군 대 vWbp) 또는 15일째(P=0.09, PBS 모의군 대 vWbp)에 스태필로코커스 부하량을 유의적으로 감소시키지 않았다. 염증성 병변의 총 수는 감소하지 않았다. 그럼에도 불구하고, 농양의 구조는 vWbp로 면역화한 후 변했다. 스태필로코커스 공동체는 농양 중심에서 검출되지 않았고, 대신 PMN 침윤물이 관찰되었다(도 17). 병용 백신, vWbp-Coa는 또한 신장 조직에서 염증 세포 수를 감소시켰고, 감염된 동물은 농양 병변을 5일 또는 15일째 나타내지 않았다(표 9).

표 9

Coa 및/또는 vWbp를 이용한 마우스의 동등면역화

정제된 백신 형질	신장 조직 중의 스타필로코커스 부하량*			신장 조직 중의 농양 형성*		
	*신장 조직의 log ₁₀ CFU g ⁻¹	*유의성 (P 값)	*log ₁₀ CFU g ⁻¹ 감소율	*표면 농양 (%)	*신장 농양 수	*유의성 (P 값)
모의	5.75 ± 0.42	-	-	<100	56	1.3 ± 0.3
vwbp	4.94 ± 0.46	0.1413	0.81	14,000 ± 5,000	45	1.8 ± 0.5
Coa	4.86 ± 0.50	0.1417	0.88	19,000 ± 4,000	25	0.3 ± 0.3
vWbp/Coa	4.84 ± 0.38	0.1195	0.90	7,000 ± 1,500	25	0.3 ± 0.3
모의	6.68 ± 0.22	-	-	<100	75	6.0 ± 1.9
vwbp	3.41 ± 0.47	0.4503	3.27	14,000 ± 5,000	20	1.8 ± 1.1
Coa	3.43 ± 0.54	0.1681	3.25	19,000 ± 4,000	20	1.2 ± 0.8
vWbp/Coa	3.79 ± 0.37	0.0263	2.89	7,000 ± 1,500	30	0.7 ± 0.5

*BALB/c 마우스 (n=18-20)에게 0일째 CFA 중에 유효된 정제된 vWbp, Coa 또는 vWbp 및 Coa를 각각 100 µl씩 주사했다. 20일에, 동물은 IgG 항체 역가에 대해 조사하고, 21일에 1×10⁷ 콜로니 형성 단위 (CFU)의 에스. 아우테우스 뉴만을 정맥내 접종하여 시험감염시켰다. 25일째, 동물을 사망시키고, 양쪽 신장을 분리했다. 한쪽 신장을 포름알데하이드에 고정시키고, 파라핀에 포매시킨 뒤, 박편화하고, 헤마톡실린-에오신 염색한 뒤, 신장당 4개의 시상면을 동양 형성에 대해 분석했다. 다른 신장은 PBS 완충액에서 파쇄하고, 파쇄액을 한천 배지 위에 도말하여 콜로니 형성시키고, 스타필로코커스 부하량을 CFU로서 계수했다.

*면역화 18 내지 20마리 BALB/c 마우스의 코호트에서 감염 4일 후 파쇄된 신장 조직 중의 log₁₀ CFU g⁻¹로 계산된 스타필로코커스 부하량의 평균, 평균의 표준 오차 (±SEM)도 표시했다.

*통계유의성은 쌍을 이루지 않은 양측 스튜던츠 t-검정으로 계산하고 P 값을 기록했다; P 값 <0.05는 유의성으로 간주했다.

*새군 부하량의 감소는 log₁₀ CFU g⁻¹로 계산했다.

*무작위로 선택한 5가지 혈청 IgG 역가의 평균은 SpA-D_{36kA} 항원을 이용한 ELISA로 스타필로코커스 감염 전에 측정했다.

*감염 4일 후 신장 조직 중의 농양 형성은 육안 조사로 측정했다(양성%).

*동물 10마리 유래의 헤마톡실린-에오신 염색된, 박편화된 신장의 조직병리검사; 신장당 농양의 평균 수를 기록하고, 다시 평균을 내어 최종 평균 (±SEM)을 구했다.

*통계유의성은 쌍을 이루지 않은 양측 스튜던츠 t-검정으로 계산하고 P 값을 기록했다; P 값 <0.05는 유의성으로 간주했다.

*에스. 아우테우스 뉴만 감염 후 5일 종의 마우스 분석;

*에스. 아우테우스 뉴만 감염 후 15일 종의 마우스 분석.

[0399]

[0400] IX. 재료 및 방법

[0401] 세균 균주 및 배양물 증식. 스타필로코커스는 트립틱 대두 한천 또는 브로쓰에서 37°C 하에 배양했다. 이. 콜라이 균주 DH5α 및 BL21(DE3)(Studier et al., 1990)은 루리아 한천 또는 브로쓰에서 37°C 하에 배양했다. 엠프실린(100 µg/ml) 및 클로람페니콜(10 µg/ml)은 pET15b(Studier et al., 1990) 및 pOS1(Schneewind et al., 1993) 플라스미드 선택에 각각 사용했다.

[0402] 돌연변이체의 생성. coa 및 vWbp의 1kb 상류 및 하류 DNA 서열은 프라이머 attB1_Coa, Coa1_BamHI, Coa2_BamHI, attbB2_Coa 및 attB1_vWF, vWF1_BamHI, vWF2_BamHI, attbB2_vWF를 사용하여 PCR 증폭시켰다(표 10). 단편은 BP 클로나제 II 키트(Invitrogen)를 사용해 pKOR1과 교환했다(Bae and Schneewind, 2005). 이 벡터들을 에스.아우레우스 뉴만에 전기천공시키고, 온도 이동 유도된 대립유전자 교환으로 처리하여 대응 결실을 만들었다(Bae and Schneewind, 2005). 돌연변이체는 유전자좌의 PCR 증폭, DNA 서열분석 및 면역블롯 분석으로 입증했다.

[0403] 상보체성 플라스미드를 만들기 위해, 프라이머 Coa_promoter_BamHI_F, Coa_out_PstI_R, vWbp_promoter_BamHI_F, vWbp_out_PstI_R(표 10)은 vWbp 또는 coa의 상류 프로모터 영역을 포함하도록 설계했고, 증폭된 영역을 pOS1에 클로닝했다. 이 플라스미드들을 서열분석으로 확인한 다음, 스타필로코커스 균주에 전기천공시켰다. 면역블롯 분석을 위해, 트립틱 대두 브로쓰(Difco)에서 증식된 스타필로코커스의 밤샘 배양물을 1:100으로 채보충하고, OD₆₀₀이 0.4가 될 때까지 37°C에서 진탕하에 증식시켰다. 각 배양물의 1ml 샘플을 테이בל탑 원심분리기로 13,000xg에서 10분 동안 원심분리하고 상청액을 회수했다. 100% w/v 용액 75µl의 트리클로로아세트산을 첨가하고, 샘플을 얼음에서 10분 동안 항온처리한 뒤, 원심분리하고 1ml 빙냉 100% 아세톤으로 세척했다. 샘플을 밤새 공기 건조하고 50µl 샘플 완충액(4% SDS, 50mM Tris-HCl, pH 8, 10% 글리세롤 및 브로모페놀 블루)에 용해했다.

[0404] **혈액 생존율 분석 및 혈액 응고.** 스타필로코커스 균주의 밤샘 배양물을 새 TSB로 1:100으로 희석하고, OD₆₀₀이 0.4에 이를 때까지 37°C에서 증식시켰다. 배양물 1ml를 원심분리하고, 스타필로코커스를 세척하고 멸균 PBS 10ml에 현탁시켜 1x10⁷ CFU/ml 현탁액을 만들었다. 시험처리된 적이 없는 6주령의 Balb/c 마우스 유래의 전 혈액을 수집하고 REFLUDAN™(Iepirudin, Bayer)을 최종 농도 50μg/ml로 첨가했다. 450μl 혈액을 1ml 엔펜도르프 튜브에 분취하고, 50μl 세균 샘플(1x10⁵ CFU/ml)과 혼합했다. 샘플은 저속 회전 하에 37°C에서 항온처리했다. 100μl 분취량을 0분 및 30분에 분리하고, 2% 사포닌/PBS와 1:1 혼합한 뒤, 얼음에서 30분 동안 항온처리했다. 5개의 1:10 연속 희석물을 만들고, 10μl 분취량을 TSA 한천 위에 도말하여 콜로니 형성 및 계수했다.

[0405] 세균 혈액 응고 활성을 평가하기 위해, 상기 스톡 세균 배양물 10 μl를 멸균 플라스틱 시험관(BD falcon) 중의 응고방지된 마우스 혈액 100 μl에 첨가하여 1x10⁵ CFU/ml의 최종 농도를 달성했다. 항체 교란을 위해, 3X10⁻⁵ M의 항체를 함유하는 PBS 10μl를 추가로 혼합물에 첨가했다. 재조합 단백질을 평가하기 위해, PBS 완충액 중의 10 μl 단백질을 50 μM의 최종 농도로 첨가했다. 시험관을 실온에서 항온처리하고 혈액 유동성 또는 응고 시간 간격마다 시험관을 45° 각도로 기울여 확인했다.

[0406] **단백질 정제.** 백신접종 연구를 위해, 성숙 Coa 또는 vWbp의 전체 길이의 암호화 서열을 프라이머 Coa_정방향_XhoI, Coa_역방향_BamHI, vWbp_정방향_XhoI, vWbp_역방향_BamHI(표 10)를 사용해 pET15b 벡터에 클로닝하여 His₆-Coa 및 His₆-vWbp를 수득했다. 발현 벡터를 수용한 이.콜라이 BL21(DE3)은 37°C에서 증식시키고 2시간 후 1mM IPTG로 유도했다. 유도 4시간 후, 세포를 6,000xg로 원심분리하고, 1x 컬럼 완충액(0.1M Tris-HCl, pH 7.5, 0.5M NaCl)에 현탁시키고 프렌치 프레스에서 14,000 lb/in² 하에 용해시켰다. 용해물을 40,000xg에서 30분 동안 초원심분리하고, 상청액을 Ni-NTA 크로마토그래피로 처리하고, 25 μM 이미다졸을 함유하는 컬럼 완충액으로 세척한 뒤, 500 μM 이미다졸로 용출시켰다. 용출물을 1x PBS로 투석했다. 내독소를 제거하기 위해, 1:1,000 트리톤-X114를 첨가하고, 용액을 5분 동안 냉각시킨 뒤, 37°C 하에 10분 동안 항온처리하고, 13,000xg에서 원심분리했다. 상청액을 HiTrap 탈염 컬럼에 로딩하여 Triton-X114의 임의의 잔여물을 제거했다.

표 10

본 연구에 사용된 프라이머	
프라이머 명칭	서열
attB1_Coa	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTgactgaagttgaaaaagaag (서열번호 46)
Coa1_BamHI	aaGGATCCcctccaaatgtaattgcc (서열번호 47)
Coa2_BamHI	aaGGATCCgtttgtaactctatccaagac (서열번호 48)
attB2_Coa	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGgacacctattgcacgattcg (서열번호 49)
attB1_vWF	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTcagatagcagattcagattcag (서열번호 50)
vWF1_BamHI	aaGGATCCctgtattttctcctaattttcc (서열번호 51)
vWF2_BamHI	aaGGATCCcatggctgcaagcaataatg (서열번호 52)
attB2_vWF	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGgacctggttaacaaattatg (서열번호 53)
Coa_promoter_BamHI_F	gaaGGATCCgtttattctagtaataatagttaatg (서열번호 54)
Coa_out_PstI_R	gaaCTGCAGctgtatgtctttggatagattac (서열번호 55)
vWbp_promoter_BamHI_F	gaaGGATCCggtggcttttacttggatttc (서열번호 56)
vWbp_out_PstI_R	gaaCTGCAGcgacaactcattatttctttgc (서열번호 57)
Coa_foward_XhoI	GAACTCGAGTCTAGCTATTTACATGG (서열번호 58)
Coa_Xho_factorXa_F	GAACTCGAGatagaagcagaatagtaacaaggattatggtgg (서열번호 59)
Coa_reverse_BamHI	GTAGGATCCTGGGATAGAGTTACAAC (서열번호 60)
vWbp_forward_XhoI	GAACTCGAGgcattatgtgtatcacaatttggg (서열번호 61)
vWbp_Xho_factorXa_F	GAACTCGAGatagaagcagagtggttctgggagaagaatc (서열번호 62)
vWbp_reverse_BamHI	GAACTCGAGgcagcattcattatttggc (서열번호 63)

[0407] 효소 연구, ELISA 및 SPR을 위해, 성숙 Coa 또는 vWbp의 전체 길이의 암호화 서열을, 코아콜라제의 초기 Ile-Val-Thr-Lys 및 vWbp의 Val-Val-Ser-Gly에 앞서 Xa 인자 부위를 함유하는 pET15b, 프라이머 Coa_Xho_factorXa_F, Coa_역방향_BamHI, vWbp_Xho_factorXa_F, vWbp_역방향_BamHI(표 10)을 이용하여 pET15b에 클로닝했다. 이 단백질들을 상기 프로토콜을 이용해 발현 및 정제하고, 그 다음 25°C에서 1시간 동안 10 단위 Xa 인자/1ml로 절단하여 N-말단으로부터 His₆ 태그를 제거했다. 단백질을 그 다음 Superdex 75(GE Healthcare) 컬럼 위에 로딩하여 최종 정제했다. 용출된 모든 단백질을 1xPBS에 저장했다.

[0409] **토끼 항체.** 단백질 농도는 BCA 키트(Thermo Scientific)를 사용하여 측정했다. 순도는 SDS page 겔 분석 및 쿠마시 브릴리언트 블루 염색으로 입증했다. 6개월령의 뉴질랜드 흰색 암컷 토끼(찰스 리버 래보레이토리즈)를 1

차 면역화를 위한 CFA(Difco) 또는 추가 면역화를 위한 IFA에 유화시킨 500 μg 단백질을 24일 및 48일째 면역화시켰다. 60일째, 토끼로부터 혈액을 뽑아 혈청을 회수해 면역블로팅 또는 수동 전이 실험을 수행했다. 항체 정제를 위해, 재조합 His₆-Coa 또는 His₆-vWbp(5mg)을 HiTrap NHS-활성화된 HP 컬럼(GE Healthcare)에 공유 결합시켰다. 이 항원-매트릭스는 그 다음 토끼 혈청 10 내지 20ml의 친화성 크로마토그래피에 4°C에서 사용했다. 충전된 매트릭스는 50ml 컬럼 용적의 PBS로 세척하고, 항체는 용출 완충액(1M 글리신 pH 2.5, 0.5M NaCl)으로 용출시키고, 즉시 1M Tris-HCl, pH 8.5로 중화시켰다. 정제된 항체는 PBS에 대해 4°C에서 밤새 투석했다.

[0410] **표면 플라스몬 공명.** 친화성 및 결합 속도와 해리 속도는 BIAcore 3000으로 측정했다. 완충액은 멸균 여과하고 탈기시켰다. CM5 칩은 0.2M EDC 및 0.05M NHS의 존재 하에 사람 프로트롬빈(500 nM, pH 4.0)(Innovative Research) 및 사람 피브리노겐(200nM, pH 4.5)을 주입하여 아민 결합을 위해 준비했다. 코아굴라제와 프로트롬빈 및 피브리노겐의 상호작용을 측정하기 위해, Coa는 HBS-P 완충액(20mM HEPES[pH 7.4], 150mM NaCl, 0.005%[vol/vol] 계면활성제 P20)에 300초 동안 코아굴라제를 연속 주입하여 0 내지 75nM 농도로 희석한 다음, 300초 동안 해리시킨 다음 NaOH(50 μl , 30초)로 재생시켰다. K_D 및 χ^2 는 BiaEvaluation 소프트웨어로 측정하고, 최량적합(best fit)은 1:1 결합 모델로 기준선 및 국소 R_{max} 를 드리프트하여 측정했다. 폰 빌레브란트 인자와 프로트롬빈 및 피브리노겐의 상호작용은 동일한 방식으로 측정했다. 모든 실험은 3반복으로 반복했다. 폴리클로날 항체로의 억제 실험은 전술한 바와 같은 주입 조건 하에 0nM 내지 200 nM의 αCoa 와 항온처리된 코아굴라제(25nM)를 연속 주입하여 수행했다. vWF(50nM)는 마찬가지로 0nM 내지 400nM의 αvWF 와 항온처리했다. 반응 차이는 주입 전부터 주입 마지막까지 반응 단위의 변화로서 측정했다.

[0411] **코아굴라제 활성의 측정.** 1×10^{-16} M의 프로트롬빈(Innovative Research)을 등몰량의 기능성 코아굴라제 또는 vWbp와 실온에서 20분 동안 예비항온처리한 뒤, 100 μl 1xPBS 총 반응 완충액 중에 1mM의 최종 농도로 S-2238(발색원성 기질)을 첨가했다. 흡광도 변화는 분광광도계에서 450nm로 10분 동안 측정하고, 시간의 함수로서 플로팅한 뒤, 선형 곡선에 피팅시켰다. 곡선의 기울기(dA/dt)는 S-2238 가수분해 속도인 것으로 해석했고, 따라서 효소 기능을 반영한다(% 코아굴라제-프로트롬빈 또는 vWbp-프로트롬빈 복합체 활성). 이 분석은 3M 과량(3×10^{-16} M)으로 첨가한 특정 항체 또는 교차 항체의 존재 하에 반복했고, 데이터는 억제 없이 평균 활성%로 표준화했다.

[0412] **신장 농양 모델 및 치사량 시험감염.** 스타필로코커스 균주의 밤샘 배양물을 새 TSB에 1:100으로 희석하고, OD₆₀₀이 0.4에 이를 때까지 증식시켰다. 세균 10ml를 7,500xg로 원심분리하고 세척한 뒤, 1xPBS 10ml에 현탁시켰다. 6주령 암컷 BALB/c 마우스(찰스 리버)에게 100 μl PBS 중의 1×10^7 CFU 스타필로코커스 현탁액을 안와후방으로 주사했다. 10마리 마우스 코호트를 사용했다. 감염 후 5일째, 이 마우스들을 CO₂ 질식사시켜 사망시키고 신장을 절제했다. 모든 기관을 표면 병변에 대해 조사하고 8 내지 10개의 우측 신장을 조직병리 단편화 및 헤마톡실린-에오신 염색을 위해 보냈다. 이 슬라이드들을 내부 농양에 대해 광학 검경법으로 조사했다. 치명적 시험감염 모델을 위해, 모든 실험 조건은 1×10^8 CFU 스타필로코커스를 투여하고 생존에 대해 감염후 10일 동안 마우스를 모니터링한 것을 제외하고는 동일하게 유지했다.

[0413] **신장 단편의 면역조직화학 염색.** 단편화된 신장을 파라핀제거하고, 자일렌 및 EtOH 대 증류수의 연속 희석물로 재수화했다. 이것을 항원 회수 완충액(DAKO, pH 6.0)에서 항온처리하고 96°C 이상의 스티머에서 20분 동안 가열했다. 세정 후, 슬라이드를 3% 과산화수소에서 5분 동안 항온처리하고, 0.025% Triton x-100-PBS 중의 10% 정상 혈청과 30분 동안 항온처리했다. 10% 사람 IgG를 30분 항온처리 동안 차단 시약으로서 사용했다(Sigma-Aldrich). 1차 항체를 가슴실에서 4°C 하에 밤샘 항온처리하기 위해 슬라이드 위에 적용했다. 사용한 1차 항체는 1:500 래트 항-마우스 프로트롬빈(Innovative Research), 1:500 토끼 항-마우스 피브리노겐(Innovative Research), 1:250 토끼-항 스타필로코아글레이스 또는 1:250 토끼 항-스타필로코커스 vwbp였다. TBS 세척 후, 슬라이드를 비오틴화된 2차 항체(비오틴화된 항-래트 IgG의 1:50 희석물, BA-4001, 벡터 래보레이토리즈 제품; 또는 비오틴화된 항-토끼 IgG의 1:200 희석물, BA-1000, 벡터 제품), 및 그 다음 ABC 시약(벡터 래보레이토리즈)과 항온처리했다. 항원-항체 결합은 DAB 기질 발색원 시스템으로 검출했다. 슬라이드를 대비염색을 위해 헤모톡실린에 순간 침지시킨 뒤, 광학 현미경으로 평가했다.

[0414] **능동 면역화.** 3주령의 BALB/c 마우스에게 100 μl CFA에 유화시킨 50 μg 단백질을 각각 주사했다. 15 마리 마우스 코호트를 사용했고, 5마리 마우스는 채혈 및 항체 역가를 위해 보존했다. 백신접종 11일 후, 마우스에게 각

각 100 μ l IFA에 유화시킨 50 μ g 단백질을 각각 추가 접종했다. 21일째, 마우스에게 신장 농양 모델에 대해 1x10⁷ CFU의 스타필로코커스 또는 치명적 시험감염을 위해 1x10⁸ CFU를 주사했다. 주사 시점에서 5마리 마우스로부터 혈액을 취해 항체 역가를 측정했다.

[0415] **항체의 수동 전이.** 감염 24시간 전에, 6주령의 BALB/c 마우스에게 Coa 및/또는 vWbp에 대한 정제 항체를 5mg/kg 체중 용량으로 주사했다. 10마리 마우스 코호트를 사용했다. 이 마우스를 1x10⁷ CFU(신장 농양 모델) 또는 1x10⁸ CFU 스타필로코커스(치명적 균혈증)로 안와후방으로 주사하여 시험감염시켰다.

[0416] 참고 문헌

[0417] 다음 인용문헌은 본원에 제시된 것에 보충적인 예시적 절차 또는 여타 세부사항을 제공하는 정도로 본원에 참고로 구체적으로 인용된다.

- 미국특허 3,791,932
- 미국특허 3,949,064
- 미국특허 4,174,384
- 미국특허 4,338,298
- 미국특허 4,356,170
- 미국특허 4,367,110
- 미국특허 4,372,945
- 미국특허 4,452,901
- 미국특허 4,474,757
- 미국특허 4,554,101
- 미국특허 4,578,770
- 미국특허 4,596,792
- 미국특허 4,599,230
- 미국특허 4,599,231
- 미국특허 4,601,903
- 미국특허 4,608,251
- 미국특허 4,683,195
- 미국특허 4,683,202
- 미국특허 4,684,611
- 미국특허 4,690,915
- 미국특허 4,690,915
- 미국특허 4,748,018
- 미국특허 4,800,159
- 미국특허 4,879,236
- 미국특허 4,952,500
- 미국특허 5,084,269
- 미국특허 5,199,942
- 미국특허 5,221,605
- 미국특허 5,238,808

[0418]

미국특허 5,302,523
미국특허 5,310,687
미국특허 5,322,783
미국특허 5,384,253
미국특허 5,464,765
미국특허 5,512,282
미국특허 5,512,282
미국특허 5,538,877
미국특허 5,538,880
미국특허 5,548,066
미국특허 5,550,318
미국특허 5,563,055
미국특허 5,580,859
미국특허 5,589,466
미국특허 5,591,616
미국특허 5,610,042
미국특허 5,620,896
미국특허 5,648,240
미국특허 5,656,610
미국특허 5,702,932
미국특허 5,736,524
미국특허 5,780,448
미국특허 5,789,215
미국특허 5,801,234
미국특허 5,840,846
미국특허 5,843,650
미국특허 5,846,709
미국특허 5,846,783
미국특허 5,849,497
미국특허 5,849,546
미국특허 5,849,547
미국특허 5,858,652
미국특허 5,866,366
미국특허 5,871,986

[0419]

미국특허 5,916,776
미국특허 5,922,574
미국특허 5,925,565
미국특허 5,925,565
미국특허 5,928,905
미국특허 5,928,906
미국특허 5,932,451
미국특허 5,935,819
미국특허 5,935,825
미국특허 5,939,291
미국특허 5,942,391
미국특허 5,945,100
미국특허 5,958,895
미국특허 5,981,274
미국특허 5,994,624
미국특허 6,00,8341
미국특허 6,288,214
미국특허 6,294,177
미국특허 6,651,655
미국특허 6,656,462
미국특허 6,733,754
미국특허 6,756,361
미국특허 6,770,278
미국특허 6,793,923
미국특허 6,814,971
미국특허 6,936,258
미국특허원 2002/0169288
미국특허원 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.

[0420]

- 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. Pure Appl. 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.*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 234:309-314, 2004.
- Blancar *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.

[0421]

- 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.

[0422]

- 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.
- Emori 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.
- GB 출원 2 202 328
- Gilles *et al.*, *Cell*, 33:717, 1983.
- Gloss *et al.*, *EMBO J.*, 6:3735, 1987.

[0423]

- 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.

[0424]

- 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. Scand.* 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.

[0425]

- 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.
- Laspija *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):341-347, 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.

[0427]

Palmqvist *et al.*, *Microbes. Infect.*, 7:1501-11, 2005.
 Panizzi *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 281:1179-1187, 2006.
 PCT 출원 PCT/US89/01025
 PCT 출원 WO 00/02523
 PCT 출원 WO 00/12132
 PCT 출원 WO 00/12689
 PCT 출원 WO 00/15238
 PCT 출원 WO 01/34809
 PCT 출원 WO 01/60852
 PCT 출원 WO 01/98499
 PCT 출원 WO 02/059148
 PCT 출원 WO 02/094868
 PCT 출원 WO 03/53462
 PCT 출원 WO 04/43407
 PCT 출원 WO 06/032472
 PCT 출원 WO 06/032475
 PCT 출원 WO 06/032500
 PCT 출원 WO 07/113222
 PCT 출원 WO 07/113223
 PCT 출원 WO 94/09699
 PCT 출원 WO 95/06128
 PCT 출원 WO 95/08348
 PCT 출원 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.

[0428]

- 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.

[0429]

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.

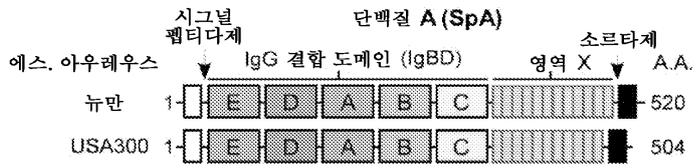
[0430]

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.

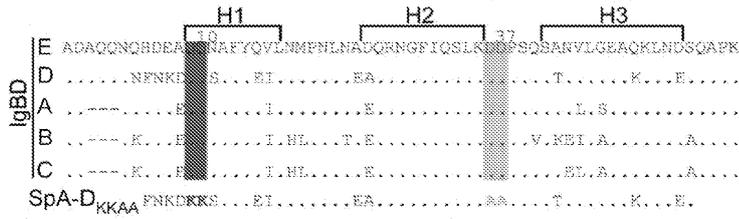
[0431]

도면

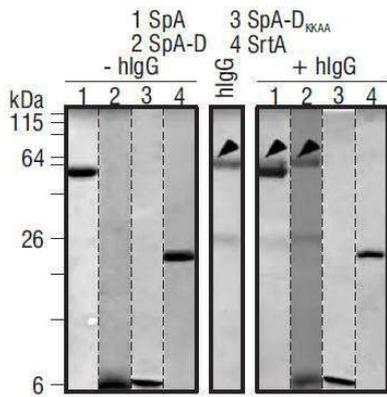
도면1a



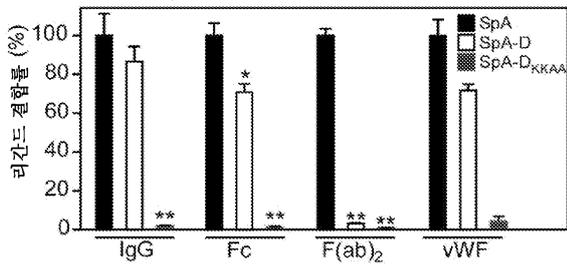
도면1b



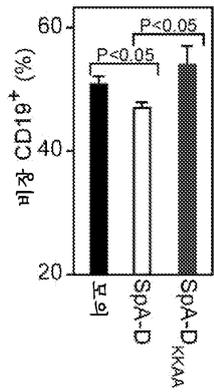
도면1c



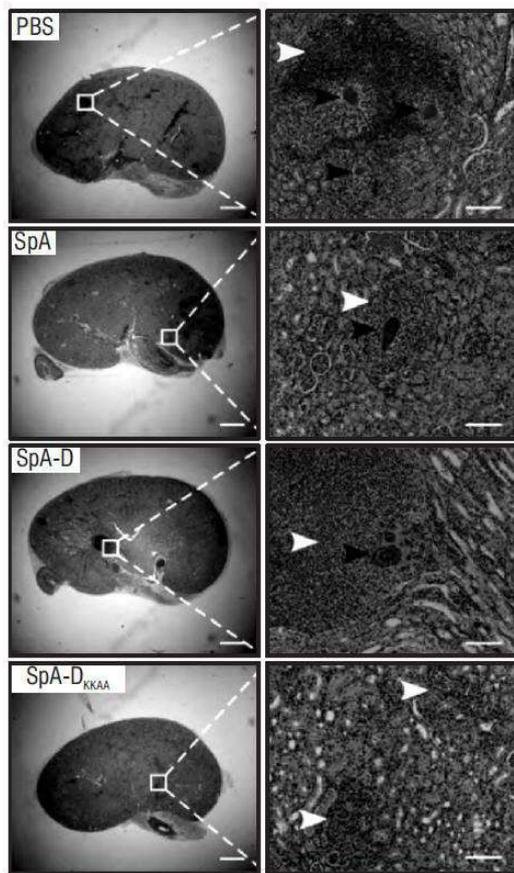
도면1d



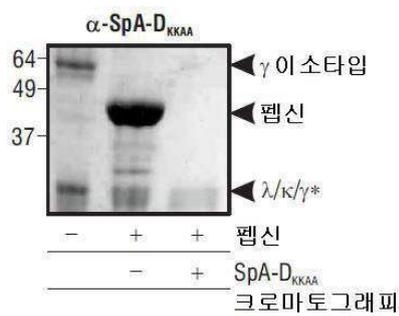
도면1e



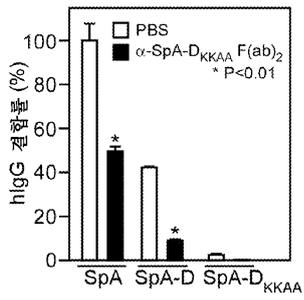
도면2



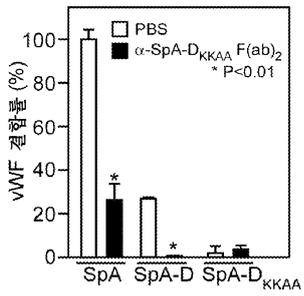
도면3a



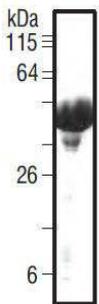
도면3b



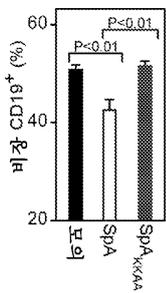
도면3c



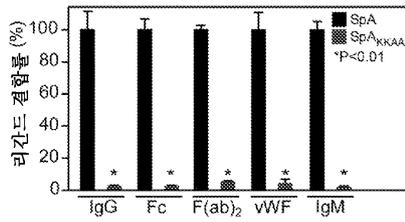
도면4a



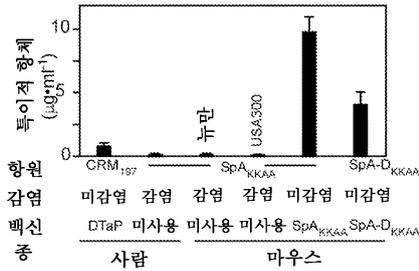
도면4b



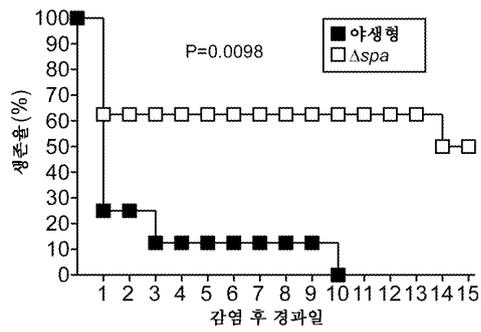
도면4c



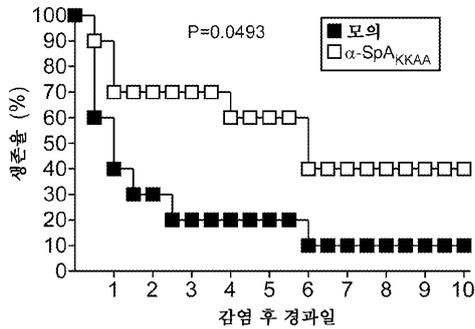
도면4d



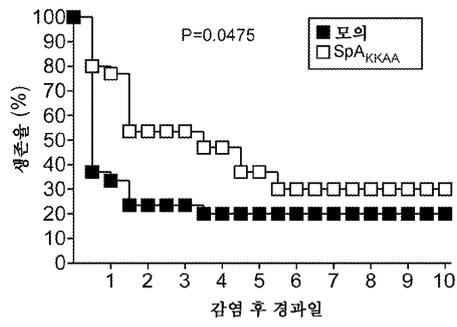
도면5



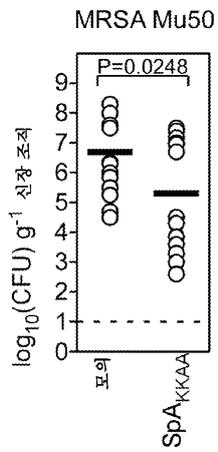
도면6a



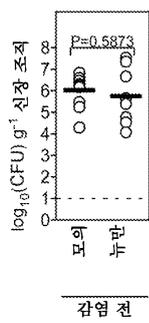
도면6b



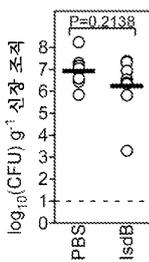
도면7



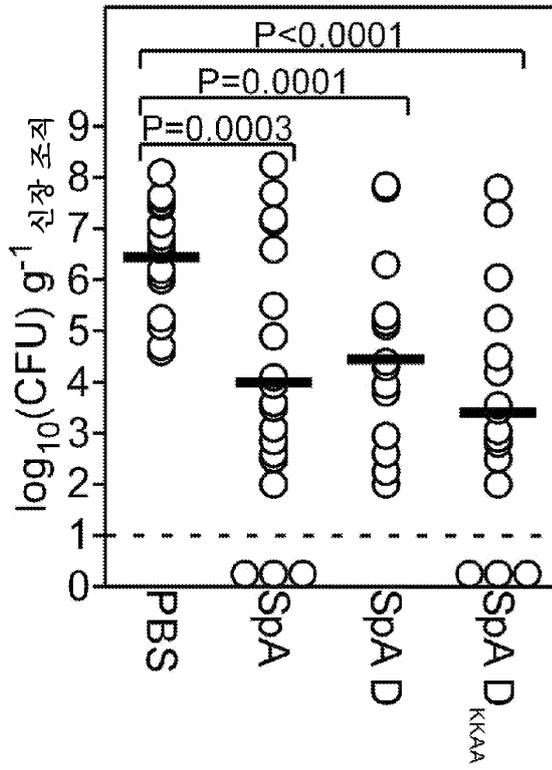
도면8a



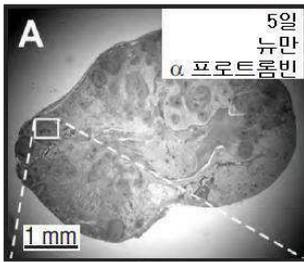
도면8b



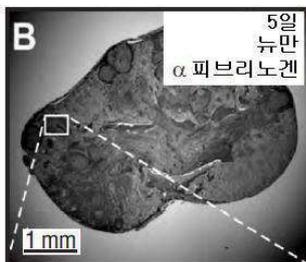
도면9



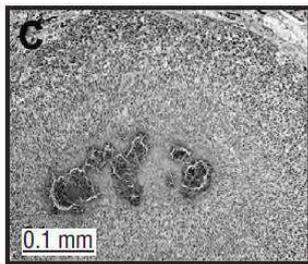
도면10a



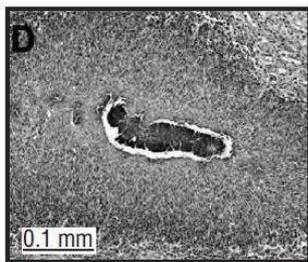
도면10b



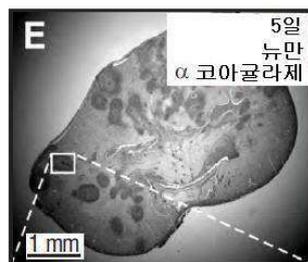
도면10c



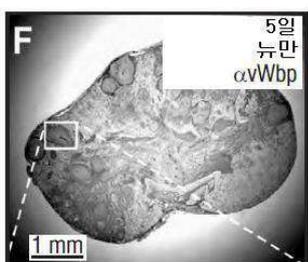
도면10d



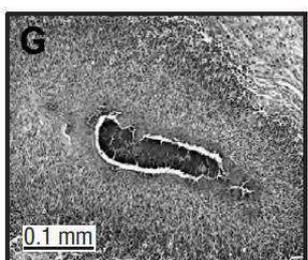
도면10e



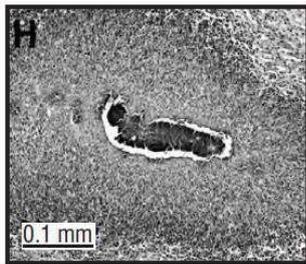
도면10f



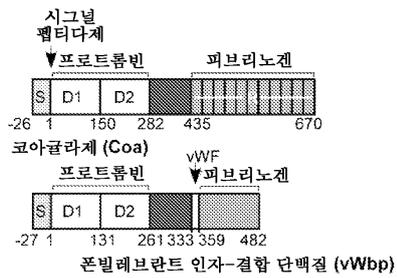
도면10g



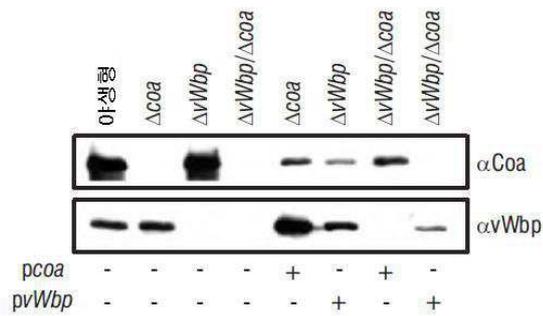
도면10h



도면11a



도면11b

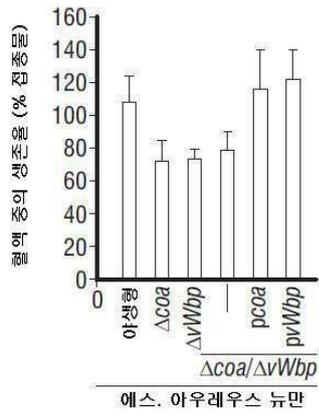


도면11c

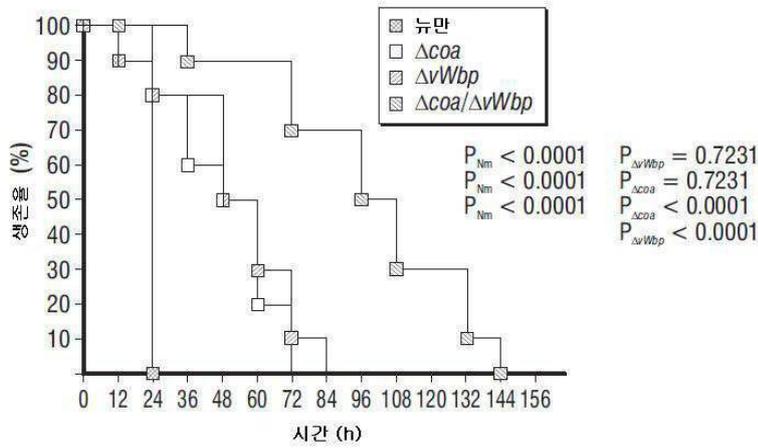
레피루딘-처리된 마우스 혈액의 에스. 아우레우스 감염

에스. 아우레우스 균주	24시간	응고 (시간)
모의		>48
뉴만		<12
ΔvWbp		24
Δcoa		36
ΔvWbp/Δcoa		>48
ΔvWbp/Δcoa + pvWbp		<12
ΔvWbp/Δcoa + pcoa		24
ΔvWbp + pvWbp		36
Δcoa + pcoa		24

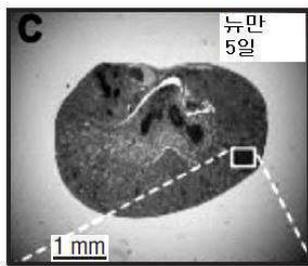
도면12a



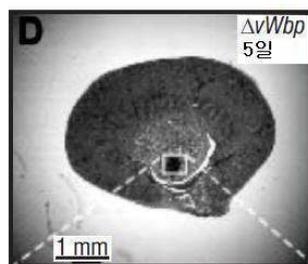
도면12b



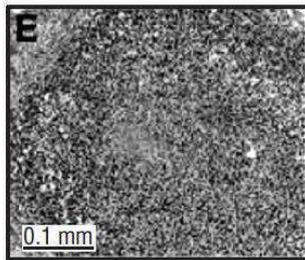
도면12c



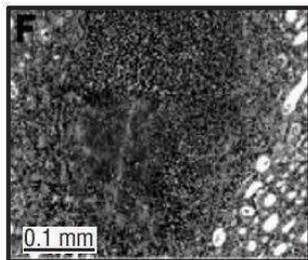
도면12d



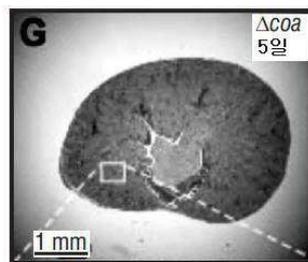
도면12e



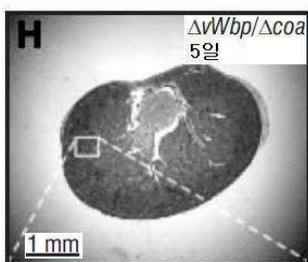
도면12f



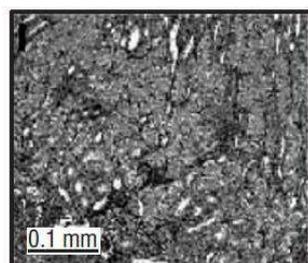
도면12g



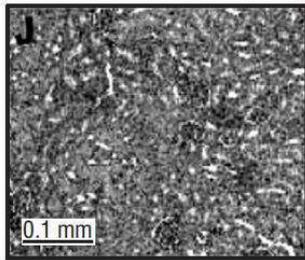
도면12h



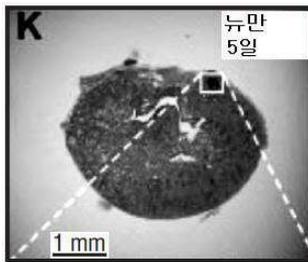
도면12i



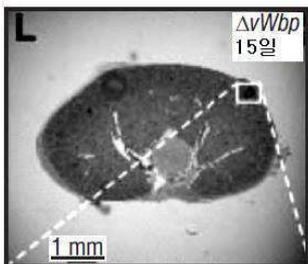
도면12j



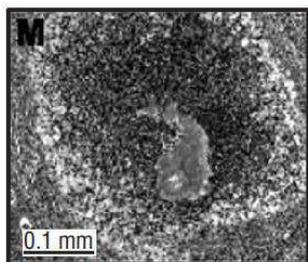
도면12k



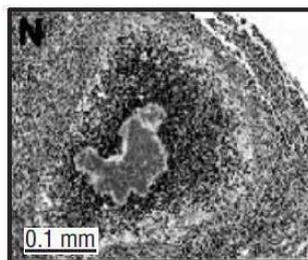
도면12l



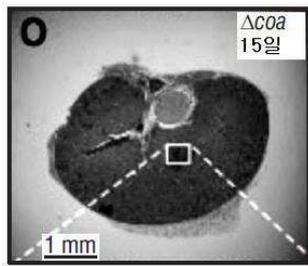
도면12m



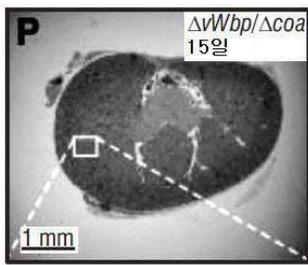
도면12n



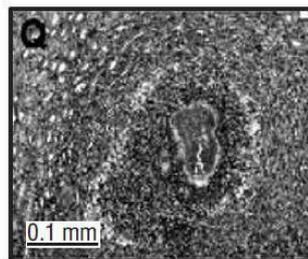
도면12o



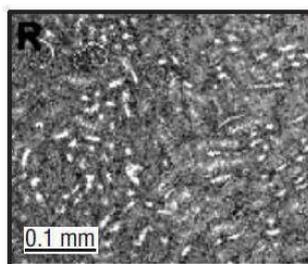
도면12p



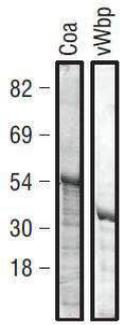
도면12q



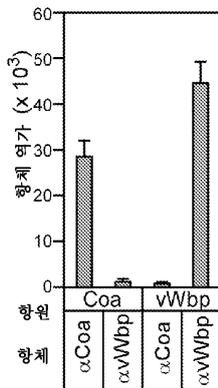
도면12r



도면13a



도면13b



도면13c

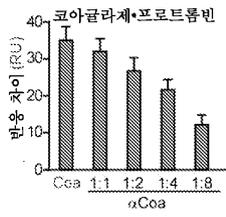
마우스 혈액의 에스. 아우레우스 감염

항체	응고	
	24시간	완료시점
모의	—	24
αV10		24
αCoa		>48
αvWbp		>48
αCoa/αvWbp		>48

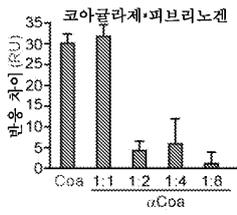
도면13d

마우스 혈액 처리	응고 시간
PBS	무한
코아글라제	< 30 분
코아글라제 + αV10	< 30 분
코아글라제 + αCoa	2 시간
코아글라제 + αvWbp	1 시간
vWbp	< 30 분
vWbp + αV10	< 30 분
vWbp + αCoa	2 시간
vWbp + αvWbp	2 시간

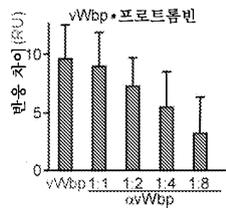
도면14a



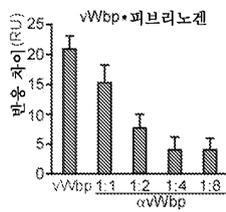
도면14b



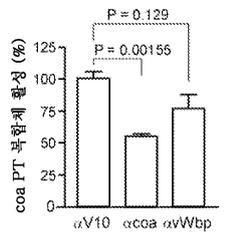
도면14c



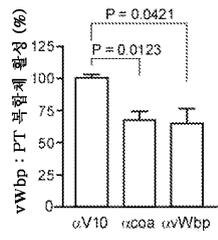
도면14d



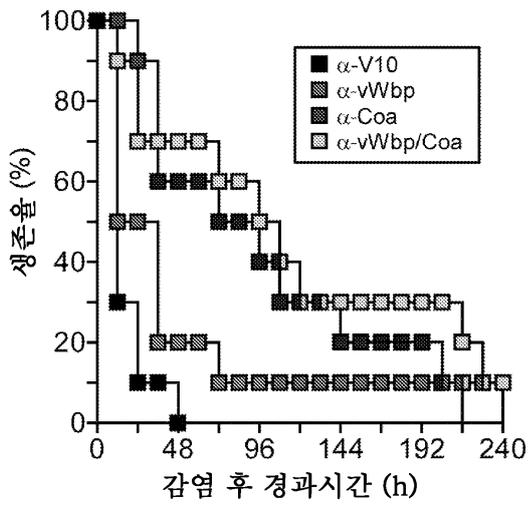
도면14e



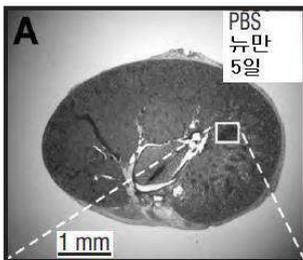
도면14f



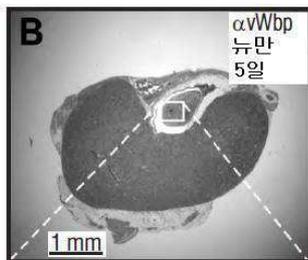
도면15



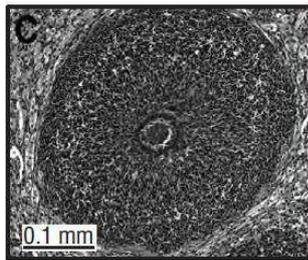
도면16a



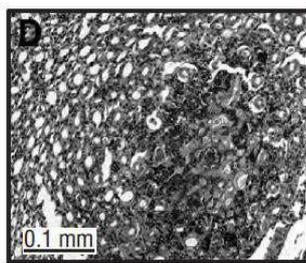
도면16b



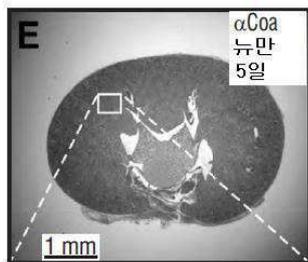
도면16c



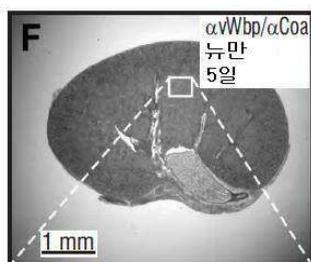
도면16d



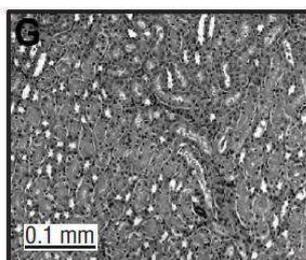
도면16e



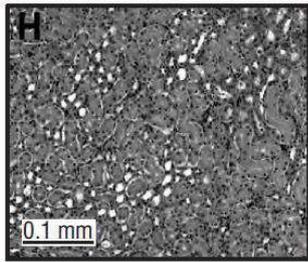
도면16f



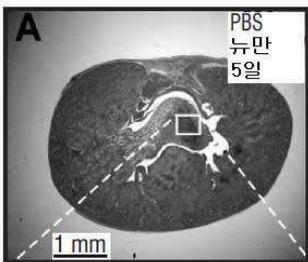
도면16g



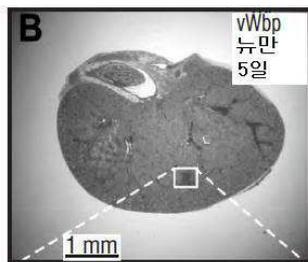
도면16h



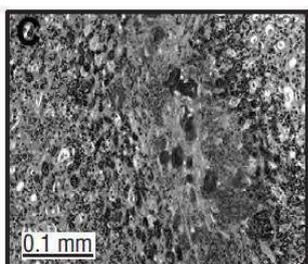
도면17a



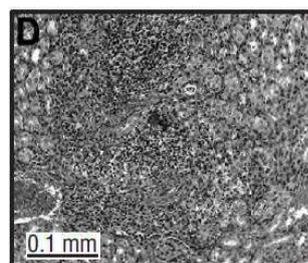
도면17b



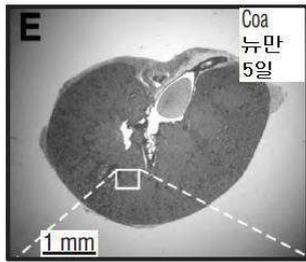
도면17c



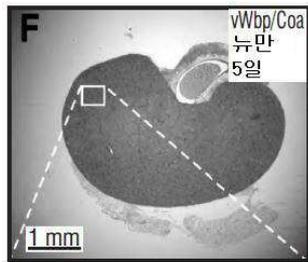
도면17d



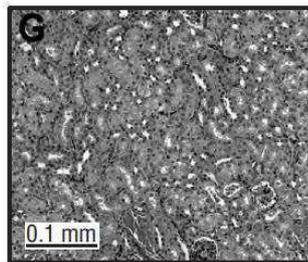
도면17e



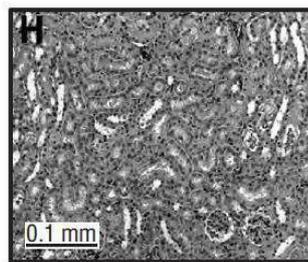
도면17f



도면17g



도면17h



서열 목록

<110> University of Chicago

<120> Compositions and methods related to Protein A (SpA) variants

<130> ARCD:482WO

<150> US 61/166,432

<151> 2009-04-03

<150> US 61/237,956

<151> 2009-08-28

<150> US 61/287,996

<151> 2009-12-18

<160> 63

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 150

<212> DNA

<213> Staphylococcus sp.

<400> 1

```

ttcaacaag atcaacaag cgccttctat gaaatcttga acatgcctaa cttaaacgaa      60
gcgcaacgta 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 can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(35)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<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> where X is any amino acid other than Q
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (12)..(35)
 <223> where X is any amino acid other than D
 <400> 8
 Asn Asn Phe Asn Lys Asp Xaa Xaa Ser Ala Phe Xaa 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 Xaa 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

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> 10

<211> 450

<212> PRT

<213> Staphylococcus sp.

<400> 10

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

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
 180 185 190
 Asp Ala Ile Lys Ser Asn Ala Glu Thr Leu Val Asp Asn Asn Ser Asn
 195 200 205
 Ser Asn Asn Glu Asn Asn Ala Asp Ile Ile Leu Pro Lys Ser Thr Ala
 210 215 220
 Pro Lys Ser Leu Asn Thr Arg Met Arg Met Ala Ala Ile Gln Pro Asn
 225 230 235 240

 Ser Thr Asp Ser Lys Asn Val Asn Asp Leu Ile Thr Ser Asn Thr Thr
 245 250 255
 Leu Thr Val Val Asp Ala Asp Asn Ser Lys Thr Ile Val Pro Ala Gln

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

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 Asp
 1220 1225 1230
 Ser Asp Ser

1235 1240 1245

Asp Ser Asp

1250 1255 1260

Ser Asp Ser

1265 1270 1275

Asp Ser Asp

1280 1285 1290

Ser Asp Ser

1295 1300 1305

Asp Ser Asp

1310 1315 1320

Ser Asp Ala Gly Lys His Thr Pro Val Lys Pro Met Ser Thr Thr

1325 1330 1335

Lys Asp His His Asn Lys Ala Lys Ala Leu Pro Glu Thr Gly Asn

1340 1345 1350

Glu Asn Ser Gly Ser Asn Asn Ala Thr Leu Phe Gly Gly Leu Phe

1355 1360 1365

Ala Ala Leu Gly Ser Leu Leu Leu Phe Gly Arg Arg Lys Lys Gln

1370 1375 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

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

Tyr Thr Pro Thr Val Lys Asn Thr Thr Ala Glu Asp Lys Asp Ser Asn
 785 790 795 800
 Gly Leu Thr Thr Thr Gly Val Ile Lys Asp Ala Asp Asn Met Thr Leu

 805 810 815
 Asp Ser Gly Phe Tyr Lys Thr Pro Lys Tyr Ser Leu Gly Asp Tyr Val
 820 825 830
 Trp Tyr Asp Ser Asn Lys Asp Gly Lys Gln Asp Ser Thr Glu Lys Gly
 835 840 845
 Ile Lys Asp Val Lys Val Thr Leu Leu Asn Glu Lys Gly Glu Val Ile
 850 855 860
 Gly Thr Thr Lys Thr Asp Glu Asn Gly Lys Tyr Arg Phe Asp Asn Leu

 865 870 875 880
 Asp Ser Gly Lys Tyr Lys Val Ile Phe Glu Lys Pro Ala Gly Leu Thr
 885 890 895
 Gln Thr Val Thr Asn Thr Thr Glu Asp Asp Lys Asp Ala Asp Gly Gly
 900 905 910
 Glu Val Asp Val Thr Ile Thr Asp His Asp Asp Phe Thr Leu Asp Asn
 915 920 925
 Gly Tyr Phe Glu Glu Asp Thr Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser

 930 935 940
 Asp Ser
 945 950 955 960
 Asp Ser
 965 970 975
 Asp Ser
 980 985 990
 Asp Ser

 995 1000 1005
 Asp Ser Asp
 1010 1015 1020
 Ser Asp Ser

1025 1030 1035
 Asp Ser Asp

1040 1045 1050
 Ser Asp Ser

1055 1060 1065
 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			
145	150	155	160
Val Pro Gln Ile Asn Tyr Asn His Arg Tyr Thr Thr His Leu Glu Phe			
	165	170	175
Glu Lys Ala Ile Pro Thr Leu Ala Asp Ala Ala Lys Pro Asn Asn Val			
	180	185	190
Lys Pro Val Gln Pro Lys Pro Ala Gln Pro Lys Thr Pro Thr Glu Gln			
	195	200	205
Thr Lys Pro Val Gln Pro Lys Val Glu Lys Val Lys Pro Thr Val Thr			
	210	215	220
Thr Thr Ser Lys Val Glu Asp Asn His Ser Thr Lys Val Val Ser Thr			
225	230	235	240
Asp Thr Thr Lys Asp Gln Thr Lys Thr Gln Thr Ala His Thr Val Lys			
	245	250	255
Thr Ala Gln Thr Ala Gln Glu Gln Asn Lys Val Gln Thr Pro Val Lys			
	260	265	270
Asp Val Ala Thr Ala Lys Ser Glu Ser Asn Asn Gln Ala Val Ser Asp			
	275	280	285
Asn Lys Ser Gln Gln Thr Asn Lys Val Thr Lys His Asn Glu Thr Pro			
	290	295	300
Lys Gln Ala Ser Lys Ala Lys Glu Leu Pro Lys Thr Gly Leu Thr Ser			
305	310	315	320
Val Asp Asn Phe Ile Ser Thr Val Ala Phe Ala Thr Leu Ala Leu Leu			
	325	330	335

Gly Ser Leu Ser Leu Leu Leu Phe Lys Arg Lys Glu Ser Lys
 340 345 350

<210> 16

<211> 645

<212> PRT

<213> Staphylococcus sp.

<400> 16

Met Asn Lys Gln Gln Lys Glu Phe Lys Ser Phe Tyr Ser Ile Arg Lys

1 5 10 15

Ser Ser Leu Gly Val Ala Ser Val Ala Ile Ser Thr Leu Leu Leu Leu

20 25 30

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
 545 550 555 560
 Thr Thr Lys Asp Val Val Gln Thr Ser Ala Gly Ser Ser Glu Ala Lys

565 570 575
 Asp Ser Ala Pro Leu Gln Lys Ala Asn Ile Lys Asn Thr Asn Asp Gly
 580 585 590
 His Thr Gln Ser Gln Asn Asn Lys Asn Thr Gln Glu Asn Lys Ala Lys
 595 600 605
 Ser Leu Pro Gln Thr Gly Glu Glu Ser Asn Lys Asp Met Thr Leu Pro
 610 615 620
 Leu Met Ala Leu Leu Ala Leu Ser Ser Ile Val Ala Phe Val Leu Pro

625 630 635 640
 Arg Lys Arg Lys Asn

645

<210> 17

<211> 80

<212> PRT

<213> Staphylococcus sp.

<400> 17

Met Asn Gln His Val Lys Val Thr Phe Asp Phe Thr Asn Tyr Asn Tyr
 1 5 10 15
 Gly Thr Tyr Asp Leu Ala Val Pro Ala Tyr Leu Pro Ile Lys Asn Leu
 20 25 30
 Ile Ala Leu Val Leu Asp Ser Leu Asp Ile Ser Ile Phe Asp Val Asn
 35 40 45
 Thr Gln Ile Lys Val Met Thr Lys Gly Gln Leu Leu Val Glu Asn Asp
 50 55 60
 Arg Leu Ile Asp Tyr Gln Ile Ala Asp Gly Asp Ile Leu Lys Leu Leu
 65 70 75 80
 <210> 18
 <211> 877
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus sp.
 <400> 18
 Met Lys Lys Arg Ile Asp Tyr Leu Ser Asn Lys Gln Asn Lys Tyr Ser
 1 5 10 15

 Ile Arg Arg Phe Thr Val Gly Thr Thr Ser Val Ile Val Gly Ala Thr
 20 25 30
 Ile Leu Phe Gly Ile Gly Asn His Gln Ala Gln Ala Ser Glu Gln Ser
 35 40 45
 Asn Asp Thr Thr Gln Ser Ser Lys Asn Asn Ala Ser Ala Asp Ser Glu
 50 55 60
 Lys Asn Asn Met Ile Glu Thr Pro Gln Leu Asn Thr Thr Ala Asn Asp
 65 70 75 80

 Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn Val Asp Ser Thr
 85 90 95
 Thr Lys Pro Met Ser Thr Gln Thr Ser Asn Thr Thr Thr Thr Glu Pro
 100 105 110
 Ala Ser Thr Asn Glu Thr Pro Gln Pro Thr Ala Ile Lys Asn Gln Ala
 115 120 125
 Thr Ala Ala Lys Met Gln Asp Gln Thr Val Pro Gln Glu Ala Asn Ser

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

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

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

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

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

Arg Ile Tyr Tyr Glu His Pro Asn Val Ala Ser Ile Lys Phe Gly Asp
 465 470 475 480

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

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

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

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

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

<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

145 150 155 160

Ser Ala Ser Gly Ser Asp Lys Gly Ser Asp Gly Thr Thr Thr Gly Gln

165 170 175

Ser Glu Ser Asn Ser Ser Asn Lys Asp Lys Val Glu Asn Pro Gln Thr

180 185 190

Asn Ala Gly Thr Pro Ala Tyr Ile Tyr Ala Ile Pro Val Ala Ser Leu

195 200 205

Ala Leu Leu Ile Ala Ile Thr Leu Phe Val Arg Lys Lys Ser Lys Gly

210 215 220

Asn Val Glu

225

<210> 20

<211> 635

<212> PRT

<213> Staphylococcus sp.

<400> 20

Met Ala Lys Tyr Arg Gly Lys Pro Phe Gln Leu Tyr Val Lys Leu Ser

1 5 10 15

Cys Ser Thr Met Met Ala Ser Ser Ile Ile Leu Thr Asn Ile Leu Pro

20 25 30

Tyr Asp Ala Gln Ala Ala Ser Glu Lys Asp Thr Glu Ile Ser Lys Glu

35 40 45

Ile Leu Ser Lys Gln Asp Leu Leu Asp Lys Val Asp Lys Ala Ile Arg

50 55 60

Gln Ile Glu Gln Leu Lys Gln Leu Ser Ala Ser Ser Lys Ala His Tyr

65 70 75 80

Lys Ala Gln Leu Asn Glu Ala Lys Thr Ala Ser Gln Ile Asp Glu Ile

85 90 95

Ile Lys Arg Ala Asn Glu Leu Asp Ser Lys Glu Asn Lys Ser Ser His

100 105 110

Thr Glu Met Asn Gly Gln Ser Asp Ile Asp Ser Lys Leu Asp Gln Leu

115 120 125

Leu Lys Asp Leu Asn Glu Val Ser Ser Asn Val Asp Arg Gly Gln Gln

130 135 140

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

<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

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
 770 775 780

Asp Ser
 785 790 795 800

Asp Ser
 805 810 815

Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Asn Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 820 825 830

Asp Ser
 835 840 845

Asp Ser
 850 855 860

Asp Ser
 865 870 875 880

Asp Ser Asp Ala Gly Lys
 885 890 895

His Thr Pro Thr Lys Pro Met Ser Thr Val Lys Asp Gln His Lys Thr
 900 905 910

Ala Lys Ala Leu Pro Glu Thr Gly Ser Glu Asn Asn Asn Ser Asn Asn
 915 920 925

Gly Thr Leu Phe Gly Gly Leu Phe Ala Ala Leu Gly Ser Leu Leu Leu
 930 935 940

Phe Gly Arg Arg Lys Lys Gln Asn Lys
 945 950

<210> 22

<211> 989

<212> PRT

<213> Staphylococcus sp.

<400> 22

Met Asn Met Lys Lys Lys Glu Lys His Ala Ile Arg Lys Lys Ser Ile

1 5 10 15

Gly Val Ala Ser Val Leu Val Gly Thr Leu Ile Gly Phe Gly Leu Leu

 20 25 30

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

 35 40 45

Ser Ala Ser Asn Glu Ser Lys Ser Asn Asp Ser Ser Ser Val Ser Ala

 50 55 60

Ala Pro Lys Thr Asp Asp Thr Asn Val Ser Asp Thr Lys Thr Ser Ser

65 70 75 80

Asn Thr Asn Asn Gly Glu Thr Ser Val Ala Gln Asn Pro Ala Gln Gln

 85 90 95

Glu Thr Thr Gln Ser Ser Ser Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro

 100 105 110

Val Thr Gly Glu Ala Thr Thr Thr Thr Thr Asn Gln Ala Asn Thr Pro

 115 120 125

Ala Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln

 130 135 140

Thr Ser Asn Glu Thr Thr Ser Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val

145 150 155 160

Asn Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln

 165 170 175

Asp Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln

 180 185 190

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

 195 200 205

Ser Thr Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp

 210 215 220

Ala Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asp Val Lys

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
 580 585 590

Ser Ala Ser Asp Ser Asp Ser Ala Ser Asp Ser Asp Ser Ala Ser Asp
 595 600 605

Ser Asp Ser Ala Ser Asp Ser Asp Ser Ala Ser Asp Ser Asp Ser Ala
 610 615 620

Ser Asp Ser Asp Ser Ala Ser Asp Ser Asp Ser Ala Ser Asp Ser Asp
 625 630 635 640

Ser Ala Ser Asp Ser Asp Ser Ala Ser Asp Ser Asp Ser Ala Ser Asp
 645 650 655

Ser Asp Ser Ala Ser Asp Ser Asp Ser Ala Ser Asp Ser Asp Ser Asp
 660 665 670

Ser Asp
 675 680 685

Ser Asp
 690 695 700

Ser Asp
 705 710 715 720

Ser Asp Ser Asp

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
 325 330 335
 Lys Arg Ile Leu Gln Leu Asn Ser Lys Asn Tyr Thr Ala Asn Leu Val
 340 345 350
 His Ala Lys Asp Val Lys Arg Ile Glu Ile Thr Val Lys Thr Gly Thr
 355 360 365
 Lys Ala Lys Ala Asp Arg Tyr Val Pro Tyr Thr Ile Ala Val Asn Gly
 370 375 380
 Thr Ser Thr Pro Ile Leu Ser Asp Leu Lys Phe Thr Gly Asp Pro Arg
 385 390 395 400
 Val Gly Tyr Lys Asp Ile Ser Lys Lys Val Lys Ser Val Leu Lys His
 405 410 415
 Asp Arg Gly Ile Gly Glu Arg Glu Leu Lys Tyr Ala Lys Lys Ala Thr
 420 425 430
 Tyr Thr Val His Phe Lys Asn Gly Thr Lys Lys Val Ile Asn Ile Asn

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
 1490 1495 1500
 Ser Gly Glu Thr Phe Thr Asn Thr Ile Thr Ala Asn Asp Asn Phe

1505	1510	1515
Gly Val Gln Ser Val Thr	Val Pro Asn Thr Ser Gln	Ile Thr Gly
1520	1525	1530
Thr Val Asp Asn Asn His Gln	His Val Ser Ala Thr	Ala Pro Asn
1535	1540	1545
Val Thr Ser Ala Thr Asn Lys	Thr Ile Asn Leu Leu	Ala Thr Asp
1550	1555	1560
Thr Ser Gly Asn Thr Ala Thr	Thr Ser Phe Asn Val	Thr Val Lys
1565	1570	1575
Pro Leu Arg Asp Lys Tyr Arg	Val Gly Thr Ser Ser	Thr Ala Ala
1580	1585	1590
Asn Pro Val Arg Ile Ala Asn	Ile Ser Asn Asn Ala	Thr Val Ser
1595	1600	1605
Gln Ala Asp Gln Thr Thr Ile	Ile Asn Ser Leu Thr	Phe Thr Glu
1610	1615	1620
Thr Val Pro Asn Arg Ser Tyr	Ala Arg Ala Ser Ala	Asn Glu Ile
1625	1630	1635
Thr Ser Lys Thr Val Ser Asn	Val Ser Arg Thr Gly	Asn Asn Ala
1640	1645	1650
Asn Val Thr Val Thr Val Thr	Tyr Gln Asp Gly Thr	Thr Ser Thr
1655	1660	1665
Val Thr Val Pro Val Lys His	Val Ile Pro Glu Ile	Val Ala His
1670	1675	1680
Ser His Tyr Thr Val Gln Gly	Gln Asp Phe Pro Ala	Gly Asn Gly
1685	1690	1695
Ser Ser Ala Ser Asp Tyr Phe	Lys Leu Ser Asn Gly	Ser Asp Ile
1700	1705	1710
Ala Asp Ala Thr Ile Thr Trp	Val Ser Gly Gln Ala	Pro Asn Lys
1715	1720	1725
Asp Asn Thr Arg Ile Gly Glu	Asp Ile Thr Val Thr	Ala His Ile
1730	1735	1740

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
2465	2470	2475
Gly Thr Ala Met Pro Thr Asn	Leu Ala Gly Gly Ser	Thr Thr Thr
2480	2485	2490
Ile Pro Val Thr Val Thr Tyr	Asn Asp Gly Ser Thr	Glu Glu Val
2495	2500	2505
Gln Glu Ser Ile Phe Thr Lys	Ala Asp Lys Arg Glu	Leu Ile Thr
2510	2515	2520
Ala Lys Asn His Leu Asp Asp	Pro Val Ser Thr Glu	Gly Lys Lys
2525	2530	2535
Pro Gly Thr Ile Thr Gln Tyr	Asn Asn Ala Met His	Asn Ala Gln
2540	2545	2550
Gln Gln Ile Asn Thr Ala Lys	Thr Glu Ala Gln Gln	Val Ile Asn
2555	2560	2565
Asn Glu Arg Ala Thr Pro Gln	Gln Val Ser Asp Ala	Leu Thr Lys
2570	2575	2580
Val Arg Ala Ala Gln Thr Lys	Ile Asp Gln Ala Lys	Ala Leu Leu
2585	2590	2595
Gln Asn Lys Glu Asp Asn Ser	Gln Leu Val Thr Ser	Lys Asn Asn
2600	2605	2610
Leu Gln Ser Ser Val Asn Gln	Val Pro Ser Thr Ala	Gly Met Thr
2615	2620	2625
Gln Gln Ser Ile Asp Asn Tyr	Asn Ala Lys Lys Arg	Glu Ala Glu
2630	2635	2640
Thr Glu Ile Thr Ala Ala Gln	Arg Val Ile Asp Asn	Gly Asp Ala
2645	2650	2655
Thr Ala Gln Gln Ile Ser Asp	Glu Lys His Arg Val	Asp Asn Ala
2660	2665	2670

Leu Thr Ala Leu Asn Gln Ala Lys His Asp Leu Thr Ala Asp Thr
 2675 2680 2685
 His Ala Leu Glu Gln Ala Val Gln Gln Leu Asn Arg Thr Gly Thr
 2690 2695 2700
 Thr Thr Gly Lys Lys Pro Ala Ser Ile Thr Ala Tyr Asn Asn Ser
 2705 2710 2715
 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
 35 40 45
 Ser Gly Lys Ser Gln Val Asn Ala Gly Ser Lys Asn Gly Thr Leu Ile
 Asp Ser Arg Tyr Leu Asn Ser Ala Leu Tyr Tyr Leu Glu Asp Tyr Ile

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

545 550 555 560
 Thr Asn Ala Tyr Asn Val Thr Thr His Gly Asn Gly Gln Val Ser Tyr
 565 570 575
 Gly Ala Arg Pro Thr Gln Asn Lys Pro Ser Lys Thr Asn Ala Tyr Asn
 580 585 590
 Val Thr Thr His Ala Asn Gly Gln Val Ser Tyr Gly Ala Arg Pro Thr
 595 600 605

 Tyr Lys Lys Pro Ser Lys Thr Asn Ala Tyr Asn Val Thr Thr His Ala
 610 615 620
 Asp Gly Thr Ala Thr Tyr Gly Pro Arg Val Thr Lys
 625 630 635
 <210> 28
 <211> 745
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus sp.
 <400> 28
 Ala Glu Gln His Thr Pro Met Lys Ala His Ala Val Thr Thr Ile Asp
 1 5 10 15
 Lys Ala Thr Thr Asp Lys Gln Gln Val Pro Pro Thr Lys Glu Ala Ala
 20 25 30

 His His Ser Gly Lys Glu Ala Ala Thr Asn Val Ser Ala Ser Ala Gln
 35 40 45
 Gly Thr Ala Asp Asp Thr Asn Ser Lys Val Thr Ser Asn Ala Pro Ser
 50 55 60
 Asn Lys Pro Ser Thr Val Val Ser Thr Lys Val Asn Glu Thr Arg Asp
 65 70 75 80
 Val Asp Thr Gln Gln Ala Ser Thr Gln Lys Pro Thr His Thr Ala Thr
 85 90 95

 Phe Lys Leu Ser Asn Ala Lys Thr Ala Ser Leu Ser Pro Arg Met Phe
 100 105 110
 Ala Ala Asn Ala Pro Gln Thr Thr Thr His Lys Ile Leu His Thr Asn
 115 120 125

Asp Ile His Gly Arg Leu Ala Glu Glu Lys Gly Arg Val Ile Gly Met
 130 135 140
 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

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
 660 665 670

Val Ser Ser Gly Thr Glu Gly Ser Gly Arg Thr Ile Glu Gly Ala Thr
 675 680 685

Val Ser Ser Lys Ser Gly Lys Gln Leu Ala Arg Met Ser Val Pro Lys
 690 695 700

Gly Ser Ala His Glu Lys Gln Leu Pro Lys Thr Gly Thr Asn Gln Ser
 705 710 715 720

Ser Ser Pro Glu Ala Met Phe Val Leu Leu Ala Gly Ile Gly Leu Ile
 725 730 735

Ala Thr Val Arg Arg Arg Lys Ala Ser
 740 745

<210> 29

<211> 628

<212> PRT

<213> Staphylococcus sp.

<400> 29

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

Gln Val Met Met Leu Gln Asp Leu Ala Arg Leu Leu Leu Lys Asn Glu
 20 25 30

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

Asn Val Leu Ile Thr Ser Trp Phe Trp Ser His Arg Pro Ser His Ile
 50 55 60

Glu Met Ala Gly Leu Lys Thr Asp Val Met Leu Ala Ala Tyr Gly Tyr
 65 70 75 80

His Met Met Asp Val Gln Ile Val Asn Glu Val Val Gln Asp Lys Thr

	85	90	95
Phe Lys His Pro Lys Phe Tyr Gln Gln Leu Phe Lys Leu Leu Glu Asp			
	100	105	110
Met Arg Val Leu Asn Ser Ile Lys Val Glu Arg Pro Ser Thr Ala Lys			
	115	120	125
Leu Ile Asp Leu Arg Leu Asp Thr Arg Ile Ser Tyr Thr Glu Ser Gln			
	130	135	140
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

<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
 325 330 335

Lys Arg Ile Leu Gln Leu Asn Ser Lys Asn Tyr Thr Ala Asn Leu Val
 340 345 350

His Ala Lys Asp Val Lys Arg Ile Glu Ile Thr Val Lys Thr Gly Thr
 355 360 365

Lys Ala Lys Ala Asp Arg Tyr Val Pro Tyr Thr Ile Ala Val Asn Gly
 370 375 380

Thr Ser Thr Pro Ile Leu Ser Asp Leu Lys Phe Thr Gly Asp Pro Arg
 385 390 395 400

Val Gly Tyr Lys Asp Ile Ser Lys Lys Val Lys Ser Val Leu Lys His
 405 410 415

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

Tyr Thr Val His Phe Lys Asn Gly Thr Lys Lys Val Ile Asn Ile Asn
 435 440 445

Ser Asn Ile Ser Gln Leu Asn Leu Leu Tyr Val Gln Asp Ile Lys Lys

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

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

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> DNA

<213> Staphylococcus sp.

<400> 35

gctgcacata tggcgcaaca cgatgaagct caac 34

<210> 36

<211> 30

<212> DNA

<213> Staphylococcus sp.

<400> 36

agtggatcct tatgctttgt tagcatctgc 30

<210> 37

<211> 19

<212> PRT

<213> Staphylococcus sp.

<400> 37

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro

1 5 10 15

Arg Gly Ser

<210> 38
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus sp.
 <400> 38
 aacatatggt caacaaagat caacaaagc 29
 <210> 39
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus sp.
 <400> 39
 aaggatccag attcgtttaa ttttttagc 29
 <210> 40
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus sp.
 <400> 40
 cttcattcaa agtcttaaag cgcceccaag ccaaagcact aac 43
 <210> 41
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus sp.
 <400> 41
 gttagtgcct tggettgggg cggctttaag actttgaatg aag 43
 <210> 42
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus sp.
 <400> 42
 catatgttca acaaagataa aaaaagcgcc ttctatgaaa tc 42
 <210> 43
 <211> 42

<212> DNA
 <213> Staphylococcus sp.
 <400> 43
 gatttcatag aaggcgcttt ttttatcttt gttgaacata tg 42
 <210> 44
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus sp.
 <400> 44
 catatgttca acaaagatgg aggaagcgcc ttctatgaaa tc 42

 <210> 45
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus sp.
 <400> 45
 gatttcatag aaggcgcttc ctccatcttt gttgaacata tg 42
 <210> 46
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus sp.
 <400> 46
 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctg atgactaagt tgaaaaaaga ag 52
 <210> 47
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus sp.
 <400> 47
 aaggatcccc tccaaaatgt aattgccc 28
 <210> 48
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus sp.

 <400> 48

aaggatccgt ttgtaactct atccaaagac 30

<210> 49

<211> 49

<212> DNA

<213> Staphylococcus sp.

<400> 49

ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtg acacctattg cagattcg 49

<210> 50

<211> 50

<212> DNA

<213> Staphylococcus sp.

<400> 50

ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctc agatagcgat tcagattcag 50

<210> 51

<211> 31

<212> DNA

<213> Staphylococcus sp.

<400> 51

aaggatccct gtattttctc cttattttc c 31

<210> 52

<211> 30

<212> DNA

<213> Staphylococcus sp.

<400> 52

aaggatccca tggctgcaaa gcaaataatg 30

<210> 53

<211> 51

<212> DNA

<213> Staphylococcus sp.

<400> 53

ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtg ccctgggtga acaaattat g 51

<210> 54

<211> 37

<212> DNA

<213> Staphylococcus sp.
 <400> 54
 gaaggatccg tttattctag ttaatatata gttaatg 37
 <210> 55
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus sp.
 <400> 55
 gaactgcagc tgiatgtctt tggatagagt tac 33
 <210> 56
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus sp.
 <400> 56
 gaaggatccg gtggcttttt tacttggatt ttc 33
 <210> 57
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus sp.
 <400> 57
 gaactgcagc gacaaactca ttatttgctt tgc 33
 <210> 58
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus sp.
 <400> 58
 gaactcgagt ctagcttatt tacatgg 27
 <210> 59
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus sp.
 <400> 59
 gaactcgaga tagaaggcag aatagtaaca aaggattata gtggg 45

<210> 60
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus sp.
 <400> 60
 gtaggatcct gggatagagt tacaac 27
 <210> 61
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus sp.
 <400> 61
 gaactcgagg cattatgtgt atcacaatt tggg 34
 <210> 62
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus sp.
 <400> 62
 gaactcgaga tagaaggcag agtggtttct ggggagaaga atc 43
 <210> 63
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Staphylococcus sp.
 <400> 63
 gaactcgagg cagccatgca ttaattattt gcc 33