

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 737 024**

51 Int. Cl.:

A61K 39/085

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.08.2013** **PCT/EP2013/067853**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.03.2014** **WO14033190**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2013** **E 13753327 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019** **EP 2890394**

54 Título: **Proteínas estabilizadas para inmunización contra Staphylococcus aureus**

30 Prioridad:

31.08.2012 US 201261695723 P

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

09.01.2020

73 Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.0%)
Rue de l'Institut 89
1330 Rixensart, BE

72 Inventor/es:

BAGNOLI, FABIO;
FALUGI, FABIANA;
GRANDI, GUIDO;
MARIANI, MASSIMO;
NISSUM, MIKKEL;
PALLAORO, MICHELE y
SAVINO, SILVANA

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 737 024 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteínas estabilizadas para inmunización contra *Staphylococcus aureus*

La presente solicitud reivindica prioridad de la Solicitud Provisoria de los Estados Unidos Núm. 61/695.723 presentada el 31 de agosto de 2012.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a composiciones inmunogénicas que comprenden antígenos derivados de *Staphylococcus aureus* y a su uso en inmunización.

Antecedentes de la técnica

10 *S. aureus* es una bacteria esférica Gram-positiva y es la principal causa de infección del torrente sanguíneo, el tracto respiratorio inferior, y la piel y otros tejidos blandos. Esto causa una serie de enfermedades de infecciones menores de la piel a enfermedades potencialmente mortales como la neumonía y septicemia, y la mortalidad asociada con *S. aureus* por año en los EE.UU. supera a la de cualquier otra enfermedad infecciosa, incluido el VIH/SIDA.

15 Actualmente no existe una vacuna autorizada contra *S. aureus*. Una vacuna basada en una mezcla de polisacáridos de superficie de tipos bacterianos 5 y 8, StaphVAX™, no logró reducir infecciones en comparación con el grupo de placebo en un ensayo clínico de fase III en 2005. La Referencia 1 informa datos sobre la vacuna "V710" de Merck and Intercell que se basa en un único antígeno, IsdB, una proteína de superficie celular secuestrante de hierro conservada [2,3]. Sin embargo, los ensayos clínicos de V710 concluyeron en 2011 con base en la observación de que era poco probable que V710 demostrara un beneficio clínico estadísticamente significativo, y un problema de seguridad con respecto a la mortalidad global y la disfunción multiorgánica que se produjeron con mayor frecuencia en las personas vacunadas en comparación con receptores de placebo [4].

20 La Referencia 5 desvela diversos antígenos de *S. aureus* y sus combinaciones como vacunas estratégicas. El documento WO2011/051917 describe antígeno de *S. aureus* FhuD2 (sta006), su secuencia de longitud completa y variantes incluyendo mutantes de supresión del extremo terminal N y C. El documento WO01/60851 describe otro antígeno no relacionado, enterotoxina estafilocócica 1 (SEC1), y mutantes del mismo en los que la cisteína se sustituye con serina para inhibir la formación de dímeros. La Referencia 6 desvela que los antígenos de polipéptidos de *S. aureus* pueden ser inestables en una solución tampón simple, y que los antígenos se pueden estabilizar por la presencia de un aditivo estabilizante, por ejemplo, EDTA. La inestabilidad de los antígenos es indeseable debido a que (1) no permite que las vacunas se almacenen durante un largo período de tiempo antes de la administración, y (2) la inconsistencia de las vacunas de partida a partida puede afectar los requisitos de aprobación de calidad y regulación. Además, la fabricación de vacunas que contienen estos antígenos inestables puede ser complicada e implicar múltiples etapas de purificación. Por lo tanto, es un objetivo de la invención identificar nuevas estrategias para estabilizar antígenos de polipéptidos de *S. aureus* en las composiciones inmunogénicas.

Divulgación de la invención

35 Los inventores de la presente han descubierto que la prevención de la oligomerización de antígenos es una estrategia eficaz para mejorar la estabilidad del antígeno. Varios antígenos de *S. aureus* contienen residuos de cisteína, y pueden formar oligómeros en soluciones tampón estándar, incluyendo dímeros covalentes formados por enlaces disulfuro entre los residuos de cisteína. Los inventores de la presente han descubierto que las composiciones que contienen estos dímeros covalentes pueden ser inestables, y pueden formar agregados o influir en la estabilidad de los otros antígenos en la composición, si están presentes. La formación de dímero covalente se puede prevenir mediante la sustitución, modificación o supresión de los residuos de cisteína de tal manera que la formación de enlaces disulfuro se elimina. Curiosamente, la prevención de estos antígenos para formar dímeros covalentes mejora la estabilidad del antígeno y mantiene una selectividad total alta de la composición (es decir, una alta proporción de isoforma única en relación con antígeno total) y la pureza. Además, los inventores de la presente han descubierto que estos antígenos de cisteína deficientes siguen siendo eficaces en la provocación de una respuesta inmune contra los antígenos que contienen cisteína de tipo salvaje. Por lo tanto, los antígenos de cisteína deficientes pueden incluirse en formulaciones de vacunas para mejorar la estabilidad del antígeno.

45 El antígeno Sta006 naturalmente tiene una cisteína en el extremo terminal N en su forma madura. Los inventores de la presente han descubierto que la supresión de la cisteína detiene la dimerización y da una proteína que es más fácil de caracterizar y analizar, sin impactar negativamente en la inmunogenicidad. Las composiciones que contienen los antígenos Sta006 deficientes de cisteína son más estables. Por lo tanto, la presente invención proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99,5% de identidad con la SEQ ID NO: 4, en la que el residuo de cisteína que corresponde a la posición 4 de la SEQ ID NO: 3 se suprime, y el polipéptido no tiene un grupo tiol libre y puede provocar anticuerpos (por ejemplo, cuando se administra a un ser humano) que reconocen un antígeno Sta006 de tipo salvaje (por ejemplo, una proteína de *S. aureus* que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2). El polipéptido no puede formar dímeros covalentes a través de enlaces disulfuro.

La presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende un polipéptido de la invención. La composición puede estar en forma acuosa, en cuyo caso tiene idealmente un pH de entre 5 y 8. La composición puede incluir también un adyuvante, por ejemplo, una sal de aluminio.

- 5 En algunas realizaciones de la invención, la composición inmunogénica comprende antígenos adicionales que pueden ser polipéptidos y/o sacáridos. Por ejemplo, también pueden incluir uno o más conjugados de sacárido capsular de *S. aureus* por ejemplo, contra una cepa de serotipo 5 y/o serotipo 8. En otras realizaciones, la composición no incluye antígenos polipeptídicos de estafilococos adicionales. En otras realizaciones, la composición no incluye ningún antígeno estafilocócico adicional. En aún otra realización, la composición no incluye antígenos adicionales.

- 10 La presente invención también proporciona un liofilizado de la composición inmunogénica de la invención. Este liofilizado se puede reconstituir con material acuoso para proporcionar una composición inmunogénica acuosa de la invención. Para la administración, el liofilizado se reconstituye de este modo con un diluyente líquido adecuado (por ejemplo, un tampón, solución salina, agua para inyección (WFI)). El diluyente líquido puede incluir un adyuvante, por ejemplo, una sal de aluminio o un adyuvante de emulsión de aceite en agua.

Sta006

- 15 El antígeno 'Sta006' se desvela como un inmunógeno útil en la Referencia 5. Originalmente se rotuló 'proteína de unión a ferricromo', y también se ha denominado 'FhuD2' en la literatura [7]. En la cepa NCTC 8325, Sta006 es SAOUHSC 02554 y tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 (GI: 88196199). En la cepa Newman es nwmn_2185 (GI:151222397). Las formas mutantes de Sta006 se presentan en la Referencia 8. El antígeno Sta006 conocido tiene una cisteína de extremo terminal N en su forma madura que puede estar lipídada. Sta006 que contiene cisteína de tipo salvaje puede existir como un monómero o un oligómero (por ejemplo, dímero covalente).

- 20 La presente invención utiliza una forma variante de Sta006 que no pueden formar dímeros covalentes a través de enlaces disulfuro. El polipéptido no contiene ningún grupo tiol libre (en condiciones reductoras). Puede provocar anticuerpos (por ejemplo, cuando se administra a un ser humano) que reconocen un antígeno Sta006 de tipo salvaje (por ejemplo, SEQ ID NO: 2). El polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 99,5% o más de identidad que cualquier SEQ ID NO: 4.

- 25 SEQ ID NO: 4 es los residuos de aminoácido 19-302 de la SEQ ID NO: 1. En comparación con la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 tiene un residuo de aminoácido adicional 'X' en el extremo terminal N, en el que 'X' es un aminoácido que no contiene un grupo tiol libre. En comparación con la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 tiene una secuencia Met-Ala-Ser en el extremo terminal N. En comparación con la SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 tiene una secuencia Met-Ala-Ser en el extremo terminal N. Un polipéptido Sta006 que comprende la SEQ ID NO: 4 o 6 se puede utilizar con la presente invención.

- 30 También se desvelan en la presente memoria formas variantes de Sta006 que comprenden al menos una mutación de un punto que reemplaza, modifica o elimina el residuo de cisteína presente en la forma de tipo salvaje del antígeno. Por ejemplo, un polipéptido Sta006 puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene la SEQ ID NO: 3, en la que el residuo de cisteína en la posición 4 de la SEQ ID NO: 3 se sustituye, modifica o elimina. Preferentemente, la sustitución es con una serina o un resto de alanina. Alternativamente, el residuo de cisteína se elimina (por ejemplo, proporcionando SEQ ID NO: 6).

Polipéptidos híbridos

- 40 Los antígenos utilizados en la presente invención pueden estar presentes en la composición como polipéptidos separados individuales. Cuando se utiliza más de un antígeno, sin embargo, no tienen que estar presentes como polipéptidos separados. En cambio, al menos dos (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, o más) antígenos pueden expresarse como una cadena polipeptídica simple (un polipéptido 'híbrido'), como se describe en la Referencia 5. El polipéptido híbrido utilizado con la presente invención idealmente no tiene ningún grupo tiol libre (en condiciones reductoras).

- 45 Los híbridos que consisten en secuencias de aminoácidos de dos, tres, cuatro, o más antígenos son útiles. En particular, se prefieren los híbridos que consisten en secuencias de aminoácidos de dos, tres, cuatro, o cinco antígenos, tal como dos antígenos.

Diferentes polipéptidos híbridos pueden mezclarse en conjunto en una única formulación. Los polipéptidos híbridos también se pueden combinar con conjugados o antígenos no de *S. aureus* como se describe en otra parte en la presente memoria.

- 50 De manera útil, estos polipéptidos híbridos pueden provocar anticuerpos (por ejemplo, cuando se administran a un ser humano) que reconocen cada una de las proteínas estafilocócicas de tipo salvaje representadas en el híbrido.

En algunas realizaciones, los antígenos en un único polipéptido híbrido se unen entre sí por una secuencia aminoácidos enlazantes. Las secuencias de aminoácidos enlazantes serán típicamente cortas (por ejemplo, 20 o menos aminoácidos, es decir, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Los ejemplos

comprenden secuencias de péptidos cortas que facilitan la clonación, o enlaces de poli-glicina. Otras secuencias de aminoácido enlazante adecuadas serán evidentes para aquellos con experiencia en la técnica.

Polipéptidos utilizados con la presente invención

La presente invención utiliza las formas variantes de los antígenos de *S. aureus* que no forman enlaces disulfuro. Los antígenos de *S. aureus* que contienen grupos tiol libres (por ejemplo, aminoácidos de cisteína) pueden formar oligómeros, incluyendo homo u heterodímeros covalentes en tampones estándar. Los dímeros covalentes se producen generalmente por oxidación de los grupos tiol de residuos de cisteína que resulta en un enlace disulfuro (es decir, la formación de una cistina). Para eliminar la formación de dímero covalente, los polipéptidos de la presente invención no contienen ningún grupo tiol libre (en condiciones reductoras) que puede reaccionar para formar enlaces disulfuro. Un grupo tiol libre, también denominado grupo tiol no protegido, o -SH libre o sin protección, tiene un átomo de azufre reactivo. Un residuo de aminoácido cisteína tiene un grupo tiol libre (en condiciones reductoras), y por lo tanto los polipéptidos de la presente invención no contienen ningún residuo de aminoácido cisteína. Un residuo de cisteína se puede derivatizar de tal manera que el grupo tiol está protegido y no puede reaccionar para formar enlaces disulfuro, por ejemplo, mediante la adición de un grupo protector de tiol. Los grupos protectores de tiol son conocidos en la técnica, por ejemplo, tioéter, tioéster o sus derivados [9]. Por lo tanto, los polipéptidos desvelados en la presente memoria pueden contener residuos de aminoácido cisteína derivatizados, a condición de que los residuos de aminoácido cisteína derivatizados no tengan grupos tiol libres (en condiciones reductoras) que pueden formar enlaces disulfuro.

En algunas divulgaciones, un polipéptido puede incluir un grupo tiol, pero este grupo tiol no es parte de la cadena lateral en un residuo de cisteína. Idealmente, sin embargo, un polipéptido no incluye grupos tiol en absoluto.

Preferentemente, el polipéptido no contiene ni cisteína ni cistina.

En algunas divulgaciones, el polipéptido puede contener aminoácido 'X'. 'X' puede ser cualquier aminoácido, a condición de que no contenga un grupo tiol libre. El aminoácido puede ser un aminoácido natural o no natural. Los aminoácidos naturales son conocidos en la técnica, por ejemplo, alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, iso-leucina, lisina leucina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina o valina. La cisteína tiene un grupo tiol libre, y por lo tanto 'X' no puede ser un residuo de cisteína. Un aminoácido no natural puede ser un aminoácido derivatizado o modificado. 'X' puede ser un aminoácido derivatizado que no contiene un grupo tiol libre, por ejemplo, metil-cisteína.

Los polipéptidos utilizados con la presente invención pueden adoptar diversas formas (por ejemplo, nativas, fusiones, glicosiladas, no glicosiladas, lipidadas, no lipidadas, fosforiladas, no fosforiladas, miristoiladas, no miristoiladas, monoméricas, multiméricas, en partículas, desnaturalizadas, etc.).

Los polipéptidos utilizados con la presente invención se pueden preparar por varios medios (por ejemplo, expresión recombinante, purificación de cultivo celular, síntesis química, etc.). Se prefieren las proteínas expresadas de forma recombinante, particularmente para polipéptidos híbridos.

Los antígenos en la composición de la presente invención se separan del organismo en el que se expresaron. De este modo, los polipéptidos Sta006 se proporcionan en forma purificada o sustancialmente purificada antes de utilizarse, es decir, sustancialmente libres de otros polipéptidos de estafilococos o células huésped. Un polipéptido Sta006 es generalmente al menos aproximadamente 80% puro (en peso) antes de utilizarse con la presente invención, y por lo general al menos aproximadamente 90% puro, es decir menos que aproximadamente 20%, y preferentemente menos que aproximadamente 10% (por ejemplo, <5%) de una composición Sta006 se compone de otros polipéptidos.

Ciertos polipéptidos desvelados en la presente memoria tienen una metionina de extremo terminal N, pero en algunas realizaciones una metionina que estaba presente en el extremo terminal N de un polipéptido naciente puede estar ausente del polipéptido en una composición de la presente invención.

Los polipéptidos utilizados con la presente invención son polipéptidos de estafilococos.

El término "polipéptido" se refiere a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados, y puede estar interrumpido por no aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que se han modificado naturalmente o mediante intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de etiquetado. También se incluyen, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Los polipéptidos pueden ocurrir como cadenas sencillas o cadenas asociadas.

La presente invención proporciona polipéptidos que comprenden una secuencia de -P-Q- o -Q-P-, en la que: -P- es una secuencia de aminoácidos de la invención como se define en la presente memoria y -Q- no es una secuencia tal como se define anteriormente, es decir, la presente invención proporciona proteínas de fusión, a condición de que los polipéptidos no contengan ningún grupo tiol libre. Cuando el codón de extremo terminal N de -P- no es ATG, pero este

codón no está presente en el extremo terminal N de un polipéptido, se traduce como el aminoácido estándar para ese codón en lugar de como Met. Cuando este codón está en el extremo terminal N de un polipéptido, sin embargo, se traduce como Met. Los ejemplos de restos -Q- incluyen, pero no se limitan a, etiquetas de histidina (es decir, His_n en la que n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más), proteína de unión a maltosa, o glutatión-S transferasa (GST).

- 5 Aunque la expresión de los polipéptidos de la presente invención puede tener lugar en un *Staphylococcus*, la invención por lo general utiliza un huésped heterólogo para la expresión (expresión recombinante). El huésped heterólogo puede ser procariota (por ejemplo, una bacteria) o eucariota. Puede ser de *E. coli*, pero otros huéspedes adecuados incluyen *Bacillus subtilis*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria cinerea*, *Mycobacteria* (por ej., *M. tuberculosis*), levaduras, etc. En comparación con los genes de *S. aureus* de tipo salvaje que
- 10 codifican polipéptidos de la presente invención, es útil cambiar los codones para optimizar la eficiencia de la expresión en tales huéspedes sin afectar a los aminoácidos codificados.

Ácidos nucleicos

- 15 La presente invención proporciona polipéptidos de codificación de ácidos nucleicos y polipéptidos híbridos de la invención. También proporciona ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica uno o más polipéptidos o polipéptidos híbridos de la invención.

La presente invención proporciona un procedimiento para producir ácido nucleico de la invención, en el que el ácido nucleico se sintetiza en parte o en su totalidad utilizando medios químicos.

La presente invención proporciona vectores que comprenden secuencias de nucleótidos de la invención (por ejemplo, vectores de clonación o expresión) y las células huésped transformadas con tales vectores.

- 20 Los procedimientos para manipular ácidos nucleicos y expresar las proteínas codificadas son conocidos en la técnica, e incluyen aquellos descritos en las Referencias 45 y 69. Una secuencia de ácido nucleico puede modificarse mediante la sustitución del codón para cisteína con un codón por otro aminoácido. La cisteína puede sustituirse por cualquier otro aminoácido, incluyendo serina, alanina, glicina, valina, leucina o isoleucina, o formas modificadas de un aminoácido que no tiene grupos tiol libres (es decir, que no puede formar fácilmente enlaces disulfuro).
- 25 Alternativamente, el residuo de cisteína puede eliminarse simplemente de la secuencia. Por lo tanto, una supresión debe eliminar el codón para la cisteína a partir de la secuencia de ácido nucleico sin la introducción de un cambio de marco. Las técnicas para hacer mutaciones de sustitución y supresión en sitios predeterminados en un ácido nucleico que tiene una secuencia conocida son bien conocidas e incluyen, pero sin limitación, mutagénesis de cebador y otras formas de mutagénesis dirigida a sitios.
- 30 La presente invención también proporciona ácido nucleico que comprende secuencias de nucleótidos que tienen identidad de secuencia con dichas secuencias de nucleótidos. La identidad entre secuencias se determina preferentemente por el algoritmo de búsqueda de homología de Smith Waterman como se describe anteriormente. Tales ácidos nucleicos incluyen los que utilizan codones alternativos para codificar el mismo aminoácido.

- 35 El ácido nucleico de acuerdo con la invención puede adoptar diversas formas (por ejemplo, monocatenario, bicatenario, vectores, cebadores, sondas, etiquetado, etc.). Los ácidos nucleicos de la presente invención pueden ser circulares o ramificados, pero generalmente son lineales. A menos que se especifique o requiera lo contrario, cualquier realización de la invención que utiliza un ácido nucleico puede utilizar tanto la forma de doble hebra y cada una de dos formas de una sola hebra complementarias que componen la forma de doble cadena. Los ácidos nucleicos de la presente invención se proporcionan preferentemente en forma purificada o sustancialmente purificada, es decir,
- 40 sustancialmente libre de otros ácidos nucleicos (por ejemplo, libre de ácidos nucleicos de origen natural), particularmente de otros ácidos nucleicos de estafilococos o célula huésped, siendo generalmente al menos aproximadamente 50% puros (en peso), y por lo general al menos aproximadamente 90% puros. Los ácidos nucleicos de la presente invención son preferentemente ácidos nucleicos de estafilococos.

- 45 Los ácidos nucleicos de la presente invención se pueden preparar de muchas maneras, por ejemplo, por síntesis química (por ejemplo, síntesis de fosoramidita de ADN) en su totalidad o en parte, mediante la digestión de ácidos nucleicos más largos usando nucleasas (por ejemplo, enzimas de restricción), mediante la unión a ácidos o nucleótidos nucleicos más cortos (por ejemplo, utilizando ligasas o polimerasas), a partir de bibliotecas genómicas o de ADNc, etc.

- 50 El término "ácido nucleico" incluye, en general, una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, que contienen desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, y/o sus análogos. Incluye los híbridos de ADN, ARN, ADN/ARN. También incluye análogos de ADN o ARN, tal como los que contienen estructuras modificadas (por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos (PNA) o fosforotioatos) o bases modificadas. Por lo tanto, la presente invención incluye ARNm, ARNt, ARNr, ribozimas, ADN, ADNc, ácidos nucleicos recombinantes, ácidos nucleicos ramificados, plásmidos, vectores, sondas, cebadores, etc. En la que el ácido nucleico de la presente invención toma la forma de ARN, que
- 55 puede tener o no un tope 5'.

Los ácidos nucleicos de la presente invención pueden ser parte de un vector, es decir, parte de una construcción de ácido nucleico diseñada para la transducción/transfección de uno o más tipos de células. Los vectores pueden ser,

por ejemplo, "vectores de clonación" que están diseñados para el aislamiento, la propagación y la replicación de los nucleótidos insertados, "vectores de expresión" que están diseñados para la expresión de una secuencia de nucleótidos en una célula huésped, "vectores virales" que están diseñados para dar como resultado la producción de un virus recombinante o partícula similar a virus, o "vectores de lanzadera", que comprenden los atributos de más de un tipo de vector. Los vectores preferidos son plásmidos. Una "célula huésped" incluye una célula individual o cultivo de células que puede ser o ha sido un receptor de ácido nucleico exógeno. Las células huésped incluyen la progenie de una única célula huésped, y la progenie puede no ser necesariamente completamente idéntica (en morfología o en complemento de ADN total) a la célula parental original debido a mutación natural, accidental, o deliberada y/o cambio. Las células huésped incluyen células transfectadas o infectadas *in vivo* o *in vitro* con un ácido nucleico de la presente invención.

Cuando un ácido nucleico es ADN, se apreciará que "U" en una secuencia de ARN se reemplaza por "T" en el ADN. De manera similar, cuando un ácido nucleico es ARN, se apreciará que "T" en una secuencia de ADN se reemplaza por "U" en el ARN.

El término "complemento" o "complementario" cuando se utiliza en relación con ácidos nucleicos se refiere a apareamiento de bases Watson-Crick. Por lo tanto, el complemento de C es G, el complemento de G es C, el complemento de A es T (o U), y el complemento de T (o U) es A. También es posible utilizar bases tal como I (la inosina purina), por ejemplo, para complementar las pirimidinas (C o T).

Cepas y variantes

Un aminoácido y secuencia de nucleótidos de ejemplo para los antígenos descritos en la presente memoria se puede hallar fácilmente en bases de datos de secuencias públicas de la cepa de *S. aureus* de NCTC 8325 y/o Newman utilizando sus números de GI, por ejemplo, pero la divulgación no se limita a las secuencias de las cepas de NCTC 8325 y Newman. Las secuencias del genoma de varias otras cepas de *S. aureus* están disponibles, incluyendo las de cepas de MRSA N315 y Mu50 [10], MW2, N315, COL, MRSA252, MSSA476, RF122, USA300 (muy virulenta), JH1 y JH9. Las técnicas de búsqueda y de alineación de estándar se pueden utilizar para identificar en cualquiera de estas (u otras) secuencias de genoma adicionales el homólogo de cualquier secuencia particular de la cepa de Newman o NCTC 8325. Además, las secuencias disponibles de las cepas de Newman y NCTC 8325 se pueden utilizar para diseñar cebadores para la amplificación de secuencias homólogas de otras cepas. Por lo tanto, la divulgación no se limita a estas dos cepas, sino más bien abarca tales variantes y homólogos de otras cepas de *S. aureus*, así como variantes no naturales. En general, las variantes adecuadas de una SEQ ID NO particular incluyen sus variantes alélicas, sus formas polimórficas, sus homólogos, sus ortólogos, sus parálogos, sus mutantes, etc., a condición de que no contengan ningún grupo tiol libre.

Por lo tanto, por ejemplo, los polipéptidos desvelados en la presente memoria pueden, en comparación con la SEQ ID NO de la presente, incluir uno o más (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, etc.) sustituciones de aminoácidos, tal como sustituciones conservadoras (es decir, sustituciones de un aminoácido con otro que tiene una cadena lateral relacionada), a condición que el nuevo residuo de aminoácido no contenga un grupo tiol libre. Los polipéptidos de la presente invención no contienen ningún resto de cisteína. Los aminoácidos codificados genéticamente se dividen generalmente en cuatro familias: (1) ácido, es decir, aspartato, glutamato; (2), básico, es decir lisina, arginina, histidina; (3) no polar, es decir, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polar sin carga, es decir, glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. La fenilalanina, el triptófano, y la tirosina se clasifican a veces conjuntamente como aminoácidos aromáticos. En general, la sustitución de aminoácidos individuales dentro de estas familias no tiene un efecto importante sobre la actividad biológica. El polipéptido de la presente invención no puede ser sustituido con una cisteína. Los polipéptidos también pueden incluir una o más (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, etc.) supresiones de aminoácido simple con respecto a las secuencias SEQ ID NO. Los polipéptidos también pueden incluir una o más (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, etc.) inserciones (por ejemplo, cada uno de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos) con respecto a las secuencias SEQ ID NO, a condición de que el residuo de aminoácido insertado no contenga ningún grupo tiol libre (por ejemplo, el aminoácido insertado no es una cisteína).

Un polipéptido utilizado con la presente invención puede comprender una secuencia de aminoácidos que:

- es idéntica (es decir, 100% idéntica) a SEQ ID NO:3 desvelada en el listado de secuencias;
 - comparte 99,5% o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO:3 desvelada en el listado de secuencias;
 - tiene 1 alteración de aminoácido individual (supresión, inserción, sustitución) en comparación con la secuencia de (a); y
 - cualquier una de las anteriores.
- cuando se alinea con una secuencia particular del listado de secuencias utilizando un algoritmo de alineación por pares, cada ventana móvil de x aminoácidos del extremo terminal N al extremo terminal C (de tal manera que para una alineación que se extiende a p aminoácidos, en la que $p > x$, hay tales ventanas $p-x+1$) tiene al menos aminoácidos alineados idénticos $x-y$, en los que: x se selecciona de 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200; y se selecciona de 0,50, 0,60, 0,70, 0,75, 0,80, 0,85, 0,90, 0,91, 0,92, 0,93, 0,94, 0,95, 0,96, 0,97, 0,98, 0,99; y si $x-y$ no es un número entero, entonces se

redondea al número entero más cercano. El algoritmo de alineación por pares preferido es el algoritmo de alineación global Needleman-Wunsch [11], utilizando parámetros por defecto (por ejemplo, con penalización de abertura de espacio en blanco = 10,0, y con penalización de extensión de espacio en blanco = 0,5, utilizando la matriz de puntuación EBLOSUM62). Este algoritmo se implementa convenientemente en la herramienta needle del paquete EMBOSS [12].

Otros polipéptidos desvelados en la presente memoria pueden comprender una secuencia de aminoácidos que:

- e) es idéntica (es decir, 100% idéntica) a una secuencia desvelada en el listado de secuencias;
- f) comparte identidad de secuencia (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o más) con una secuencia desvelada en el listado de secuencias;
- g) tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 (o más) alteraciones de aminoácido individual (supresiones, inserciones, sustituciones), que pueden estar en lugares separados o pueden ser contiguas, en comparación con las secuencias de (e) o (f); y
- h) cuando se alinea con una secuencia particular del listado de secuencias utilizando un algoritmo de alineación por pares, cada ventana móvil de x aminoácidos del extremo terminal N al extremo terminal C (de tal manera que para una alineación que se extiende a p aminoácidos, en la que $p > x$, hay tales ventanas $p-x+1$) tiene al menos aminoácidos alineados idénticos $x \cdot y$, en los que: x se selecciona de 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200; y se selecciona de 0,50, 0,60, 0,70, 0,75, 0,80, 0,85, 0,90, 0,91, 0,92, 0,93, 0,94, 0,95, 0,96, 0,97, 0,98, 0,99; y si $x \cdot y$ no es un número entero, entonces se redondea al número entero más cercano. El algoritmo de alineación por pares preferido es el algoritmo de alineación global Needleman-Wunsch [13], utilizando parámetros por defecto (por ejemplo, con penalización de abertura de espacio en blanco = 10,0, y con penalización de extensión de espacio en blanco = 0,5, utilizando la matriz de puntuación EBLOSUM62). Este algoritmo se implementa convenientemente en la herramienta needle del paquete EMBOSS [14];

a condición de que el polipéptido no contenga ningún grupo tiol libre.

Cuando se utilizan polipéptidos híbridos, los antígenos individuales dentro del híbrido (es decir, restos -X- individuales) pueden ser de una o más cepas. Cuando $n=2$, por ejemplo, X_2 puede ser de la misma cepa que X_1 o de una cepa diferente. Cuando $n=3$, las cepas pueden ser (i) $X_1=X_2=X_3$ (ii) $X_1=X_2 \neq X_3$ (iii) $X_1 \neq X_2 = X_3$ (iv) $X_1 \neq X_2 \neq X_3$ o (v) $X_1 = X_3 \neq X_2$, etc.

Dentro del grupo (c), las supresiones o sustituciones pueden ser en el extremo terminal N y/o extremo terminal C, o pueden ser entre los dos extremos. Así, un truncamiento es un ejemplo de una supresión. Los truncamientos pueden implicar la supresión de hasta 40 (o más) aminoácidos en el extremo terminal N y/o extremo terminal C. El truncamiento en el extremo terminal N puede eliminar péptidos líder, por ejemplo, para facilitar la expresión recombinante en un huésped heterólogo. El truncamiento en el extremo terminal C puede eliminar las secuencias de anclaje, por ejemplo, para facilitar la expresión recombinante en un huésped heterólogo.

En general, cuando un antígeno comprende una secuencia que no es idéntica a una secuencia de *S. aureus* completa del listado de secuencias (por ejemplo, cuando comprende un listado de secuencias con <100% de identidad de secuencia con la misma, o cuando comprende un fragmento de la misma) es preferido en cada caso individual que el antígeno pueda obtener un anticuerpo que reconoce la secuencia de *S. aureus* completa respectiva.

Combinaciones con sacáridos

Las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden comprender además antígenos de sacáridos (por ejemplo, los antígenos de sacáridos conocidos incluyen el exopolisacárido de *S. aureus*, que es una poli-N-acetilglucosamina (PNAG), y los sacáridos capsulares de *S. aureus*, que pueden ser, por ejemplo, de tipo 5, tipo 8 o tipo 336). En algunas realizaciones, una composición no incluye un antígeno de sacárido de *S. aureus*.

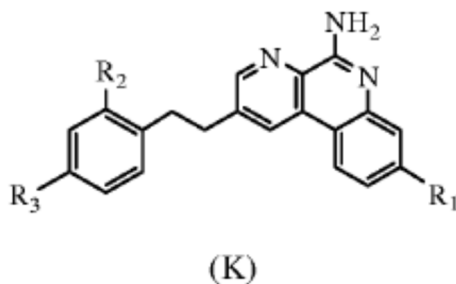
Combinaciones con antígenos no de estafilococos

Las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden comprender además antígenos no de estafilococos, y en particular con antígenos de bacterias asociadas con infecciones nosocomiales. Por ejemplo, la composición inmunogénica puede comprender además uno o más antígenos seleccionados del grupo que consiste en: *Clostridium difficile*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Candida albicans*; y *Escherichia coli* extraintestinal patógena. Otros antígenos adecuados para uso en combinación con antígenos de estafilococos de la presente invención se enumeran en las páginas 33-46 de la Referencia 15.

Composiciones preferidas

En algunas realizaciones, la composición puede incluir uno o más polipéptidos adicionales. Si la composición no incluye uno o más polipéptidos adicionales, se prefiere que estos no contengan grupos tiol libres. Preferentemente, los polipéptidos son polipéptidos de estafilococos adicionales, por ejemplo, los polipéptidos de *S. aureus* desvelados en la Referencia 5.

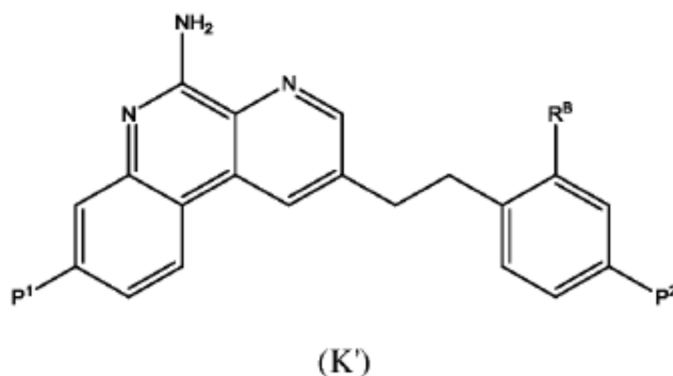
- 5 La composición de la presente invención es particularmente útil cuando se utilizan agonistas de TLR7 de la fórmula (K). Estos agonistas se discuten en detalle en la Referencia 16:



en la que:

- 10 R^1 es H, alquilo C_1-C_6 , $-C(R^5)_2OH$, $-L^1R^5$, $-L^1R^6$, $-L^2R^5$, $-L^2R^6$, $-OL^2R^5$, u $-OL^2R^6$; L^1 es $-C(O)-$ u $-O-$;
- L^2 es alquilenos C_1-C_6 , alquenileno C_2-C_6 , arileno, heteroarileno o $-((CR^4R^4)_pO)_q(CH_2)_p-$, en el que el alquilenos C_1-C_6 y alquenileno C_2-C_6 de L^2 están opcionalmente sustituidos con 1 a 4 grupos fluoro;
- cada L^3 se selecciona independientemente de alquilenos C_1-C_6 y $-((CR^4R^4)_pO)_q(CH_2)_p-$, en el que el alquilo C_1-C_6 de L^3 está opcionalmente sustituido con 1 a 4 grupos fluoro;
- L^4 es arileno o heteroarileno;
- 15 R^2 es H o alquilo C_1-C_6 ;
- R^3 se selecciona de alquilo C_1-C_4 , $-L^3R^5$, $-L^1R^5$, $-L^3R^7$, $-L^3L^4L^3R^7$, $-L^3L^4R^5$, $-L^3L^4L^3R^5$, $-OL^3R^5$, $-OL^3R^7$, $-OL^3L^4R^7$, $-OL^3L^4L^3R^7$, $-OR^8$, $-OL^3L^4R^5$, $-OL^3L^4L^3R^5$ y $-C(R^5)_2OH$;
- cada R^4 se selecciona independientemente de H y fluoro;
- R^5 es $-P(O)(OR^9)_2$;
- 20 R^6 es $-CF_2P(O)(OR^9)_2$ o $-C(O)OR^{10}$;
- R^7 es $-CF_2P(O)(OR^9)_2$ o $-C(O)OR^{10}$;
- R^8 es H o alquilo C_1-C_4 ;
- cada R^9 se selecciona independientemente de H y alquilo C_1-C_6 ;
- R^{10} es H o alquilo C_1-C_4 ;
- 25 cada p se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5 y 6, y
- q es 1, 2, 3 o 4.

El compuesto de fórmula (K) es preferentemente de fórmula (K'):



en la que:

P¹ se selecciona de H, alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido con COOH e -Y-L-X-P(O)(OR^X)(OR^Y);

P² se selecciona de H, alquilo C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆ e -Y-L-X-P(O)(OR^X)(OR^Y);

5 con la condición de que al menos uno de P¹ y P² es -Y-L-X-P(O)(OR^X)(OR^Y);

R^B se selecciona de H y alquilo C₁-C₆;

R^X y R^Y se seleccionan independientemente de H y alquilo C₁-C₆;

X se selecciona de un enlace covalente, O y NH;

Y se selecciona de un enlace covalente, O, C(O), S y NH;

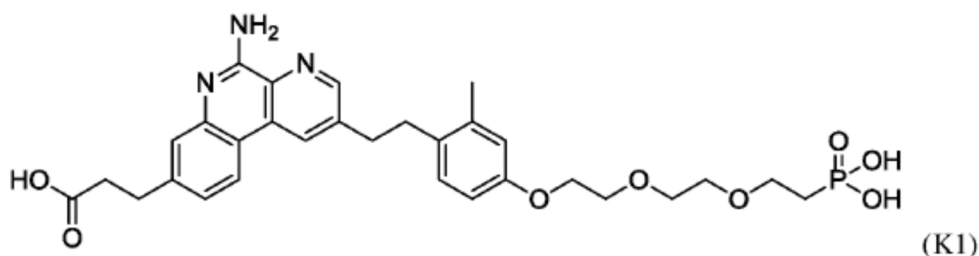
10 L se selecciona de un enlace covalente, alquilenos C₁-C₆, alquilenos C₁-C₆, arileno, heteroarileno, alquilenoxi C₁-C₆ y -((CH₂)_pO)_q(CH₂)_p-, cada uno opcionalmente sustituido con 1 a 4 sustituyentes seleccionados independientemente de halo, OH, alquilo C₁-C₄, -OP(O)(OH)₂ y -P(O)(OH)₂;

cada p se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5 y 6; y

q se selecciona de 1, 2, 3 y 4.

15 En algunas realizaciones de la fórmula (K'): P¹ se selecciona de alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido con COOH e -Y-L-X-P(O)(OR^X)(OR^Y); P² se selecciona de alcoxi C₁-C₆ e -Y-L-X-P(O)(OR^X)(OR^Y); R^B es alquilo C₁-C₆; X es un enlace covalente; L se selecciona de alquilenos C₁-C₆ y -((CH₂)_pO)_q(CH₂)_p-, cada uno opcionalmente sustituido con 1 a 4 sustituyentes seleccionados independientemente de halo, OH, alquilo C₁-C₄, -OP(O)(OH)₂ y -P(O)(OH)₂; cada p se selecciona independientemente de 1, 2 y 3; q se selecciona de 1 y 2.

20 Un compuesto preferido de la fórmula (K) para uso con la presente invención es ácido 3-(5-amino-2-(2-metil-4-(2-(2-(2-fosfonoeto)eto)eto)fenetil)benzo[f][1,7]naftiridin-8-il)propanoico, o compuesto 'K1':



Este compuesto puede utilizarse como base libre o en la forma de una sal aceptables para uso farmacéutico, por ejemplo, una sal de arginina.

25 Los compuestos de la fórmula (K) se pueden mezclar con una sal de metal insoluble (preferentemente una sal de aluminio, tal como un hidróxido de aluminio), y el compuesto típicamente se adsorbe a la sal de metal. El antígeno Sta006 (y, opcionalmente, más antígenos en una composición) puede también adsorberse a la sal de metal. Así, una composición preferida comprende (i) un antígeno Sta006 como se define en la presente memoria (ii) un agonista de TLR7 de la fórmula (K), tal como la fórmula (K1), y (iii) una sal de metal insoluble, tal como un hidróxido de aluminio.

30 El agonista de TLR7 y el antígeno Sta006 se adsorben preferentemente en la sal de metal.

Aditivos estabilizantes

En algunas realizaciones de la presente invención una composición inmunogénica incluye un aditivo estabilizante. Tales aditivos incluyen, pero no se limitan a, quelantes de cationes metálicos divalentes (por ejemplo, EDTA, ácido etilendiaminotetraacético), azúcares (por ejemplo, disacáridos tal como sacarosa o trehalosa), alcoholes de azúcar (por ejemplo, manitol), aminoácidos libres (por ejemplo, arginina), sales tampón (por ejemplo, fosfato, citrato), polioles (por ejemplo, glicerol, manitol), o inhibidores de la proteasa.

EDTA es un aditivo preferido. La concentración final de EDTA en la composición inmunogénica de la presente invención puede ser de aproximadamente 1-50 mM, aproximadamente 1-10 mM o aproximadamente 1-5 mM, Preferentemente de aproximadamente 2,5 mM.

Un tampón es otro aditivo útil, con el fin de controlar el pH de una composición. Esto puede ser particularmente importante después de la reconstitución de material liofilizado. Las composiciones de la presente invención pueden incluir uno o más tampones. Los tampones típicos incluyen: un tampón de fosfato; un tampón Tris; un tampón de borato; un tampón de succinato; un tampón de histidina; o un tampón de citrato. Un tampón de fosfato es preferente. Los tampones típicamente se incluyen en el intervalo de 5-20 mM. Las composiciones acuosas de la presente invención tienen preferentemente un pH entre 5 y 8 por ejemplo, entre 5,5-6,5, o 5,9-6,1, o un pH de 6.

Un sacárido o alcohol de azúcar (o mezcla de los mismos, por ejemplo, una mezcla de manitol/sacarosa) también es útil, en particular cuando se utiliza liofilización. Los materiales adecuados incluyen, pero no se limitan a, manitol, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrosa, etc. Particularmente se prefiere el uso de sacarosa. Tales materiales pueden estar presentes en una concentración de aproximadamente 1% en peso por volumen, o aproximadamente 3% a aproximadamente 6% en peso por volumen, o hasta aproximadamente 10% o aproximadamente 12,5% en peso por volumen, preferentemente aproximadamente 5% en peso por volumen.

Liofilización

Una forma de almacenar composiciones inmunogénicas de la presente invención es en forma liofilizada. Este procedimiento se puede utilizar con o sin la adición de un quelante de metales (por ejemplo, EDTA). Los inventores de la presente también han demostrado que el EDTA no tiene un impacto significativo en la característica térmica de la vacuna y no introduce ningún efecto plastificante no deseado, lo que significa, por lo tanto, que las composiciones que contienen EDTA pueden liofilizarse para mejorar aún más la estabilidad de almacenamiento.

Así, generalmente, la presente invención también proporciona un liofilizado que comprende un quelante de cationes de metal divalente (por ejemplo, EDTA) y al menos un antígeno (por ejemplo, al menos un antígeno polipéptido).

La presente invención también proporciona un liofilizado de una composición inmunogénica acuosa de la invención. Este se prepara por liofilización de una composición acuosa de la invención. Después, se puede reconstituir con material acuoso para proporcionar una composición inmunogénica acuosa de la invención. Los materiales presentes en el material que se liofiliza permanecen en el liofilizado y por lo tanto también están presente después de la reconstitución, por ejemplo, sales tampón, lioprotectores (por ejemplo, sacarosa y/o manitol), quelantes, etc. Si el material se reconstituye con un menor volumen de material que antes de la liofilización, entonces estos materiales están presentes en forma más concentrada. El liofilizado reconstituido contiene preferentemente lioprotectores (por ejemplo, sacarosa y/o manitol) a una concentración de hasta aproximadamente 2,5% en peso por volumen, preferentemente de aproximadamente 1% a aproximadamente 2% en peso por volumen. La cantidad de EDTA que está presente en una composición antes de la liofilización es idealmente de al menos 0,75 mM, y preferentemente al menos 2,5 mM. Se prevé un máximo de 50 mM.

Los materiales líquidos útiles para reconstituir liofilizados incluyen, pero no se limitan a: soluciones de sal, tal como solución salina fisiológica; tampones, tal como PBS; agua, tal como WFI. Útilmente tienen un pH entre 4,5 y 7,5, por ejemplo, entre 6,8 y 7,2. El liofilizado reconstituido tiene preferentemente un pH entre 5-6,5 por ejemplo, entre 5,8-6,2, o 5,9-6,1, o un pH de 6. Un material líquido para la reconstitución puede incluir un adyuvante, por ejemplo, un adyuvante de sal de aluminio. Las suspensiones acuosas de adyuvantes (incluyendo opcionalmente tampones, tal como un tampón de histidina) son útiles para la reconstitución y adsorción simultánea de polipéptidos liofilizados. En otras realizaciones, el material líquido está libre de adyuvante. Típicamente, el liofilizado no incluye un adyuvante de sal de metal insoluble.

La presente invención también proporciona un liofilizado que comprende EDTA y al menos un antígeno.

Composiciones inmunogénicas y medicamentos

Las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden ser útiles como vacunas. Las vacunas de acuerdo con la invención pueden ser profilácticas (es decir, para prevenir la infección) o terapéuticas (es decir, para tratar la infección), pero normalmente son profilácticas.

Por lo tanto, las composiciones pueden ser aceptables para uso farmacéutico. Por lo general, incluyen componentes además de los antígenos, por ejemplo, típicamente incluyen uno o más vehículos y/o excipientes farmacéuticos. Una discusión exhaustiva de tales componentes está disponible en la Referencia 42.

5 Las composiciones generalmente se administran a un mamífero en forma acuosa. Antes de la administración, sin embargo, la composición puede haber estado en una forma no acuosa. Por ejemplo, aunque algunas composiciones inmunogénicas se fabrican en forma acuosa, luego se llenan y distribuyen y administran también en forma acuosa, otras composiciones inmunogénicas se liofilizan durante la fabricación y se reconstituyen en una forma acuosa en el momento de uso. Así, una composición de la invención puede estar seca, tal como una formulación liofilizada.

10 Cuando una composición de la presente invención incluye más de un polipéptido, la masa de cada polipéptido diferente puede ser igual o diferente. Idealmente están presentes en masas sustancialmente iguales, es decir, la masa de cada uno está dentro de 65% de la masa media de todos los polipéptidos. En realizaciones en las que dos antígenos están presentes como un polipéptido híbrido, el híbrido se considera un único polipéptido para este propósito. Los factores que pueden influir en la cantidad del polipéptido que deben incluirse en una formulación multivalente incluyen la cantidad de polipéptido suficiente para provocar una respuesta inmune y la cantidad que puede causar la agregación (con sí mismo o con otro polipéptido) o influir en la estabilidad del otro polipéptido. Las masas típicas de un polipéptido en una composición inmunogénica están entre 1-100 µg.

15 La composición puede incluir conservantes tal como tiomersal o 2-fenoxietanol. Se prefiere, sin embargo, que las composiciones inmunogénicas estén sustancialmente libres (es decir, menos que 5 µg/ml) de material mercurial, por ejemplo, libres de tiomersal. Las composiciones que contienen mercurio son más preferidas. Son particularmente preferidas las composiciones sin conservantes.

20 Para mejorar la estabilidad térmica, una composición puede incluir un agente protector de la temperatura. Se proporcionan a continuación detalles adicionales de tales agentes. Para controlar la tonicidad, se prefiere incluir una sal fisiológica, tal como una sal de sodio. Se prefiere el cloruro de sodio (NaCl), que puede estar presente entre 1 y 20 mg/ml por ejemplo, aproximadamente 1062 mg/ml de NaCl. Otras sales que pueden estar presentes incluyen cloruro de potasio, dihidrógeno fosfato de potasio, fosfato disódico dihidratado, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, etc.

Las composiciones generalmente tienen una osmolalidad entre 200 mOsm/kg y 400 mOsm/kg, preferentemente entre 240-360 mOsm/kg, y más preferentemente están dentro del intervalo de 290-310 mOsm/kg.

30 Las composiciones pueden incluir uno o más tampones. Los tampones típicos incluyen: un tampón de fosfato; un tampón de Tris; un tampón de borato; un tampón de succinato; un tampón de histidina (en particular, con un adyuvante de hidróxido de aluminio); o un tampón de citrato. Los tampones típicamente se incluyen en el intervalo de 5-20 mM. El tampón es preferentemente de 10 mM de fosfato de potasio.

El pH de las composiciones está preferentemente entre aproximadamente 5 y aproximadamente 8, y más preferentemente entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 6,5, y lo más preferentemente aproximadamente 6.

35 La composición es preferentemente estéril. La composición es preferentemente no pirogénica, por ejemplo, que contiene <1 UE (unidad de endotoxina, una medida estándar) por dosis, y preferentemente <0,1 UE por dosis. La composición preferentemente está libre de gluten.

40 La composición puede incluir material para una única inmunización o puede incluir material para múltiples inmunizaciones (es decir, un kit 'multidosis'). La inclusión de un conservante se prefiere en las disposiciones de dosis múltiples. Como alternativa (o además) a la inclusión de un conservante en composiciones de dosis múltiples, las composiciones pueden estar contenidas en un recipiente que tiene un adaptador aséptico para la eliminación de material.

Las vacunas humanas se administran típicamente en un volumen de dosis de aproximadamente 0,5 ml, aunque una dosis media (es decir, aproximadamente 0,25 ml) se puede administrar a niños.

45 Las composiciones inmunogénicas de la presente invención también pueden comprender uno o más agentes inmunorreguladores. Preferentemente, uno o más de los agentes inmunorreguladores incluyen uno o más adyuvantes. Los adyuvantes pueden incluir un adyuvante TH1 y/o un adyuvante de TH2, discutidos a continuación. Por lo tanto, las composiciones inmunogénicas pueden comprender además un adyuvante, tal como un adyuvante de sal de aluminio (por ejemplo, uno o más antígenos se pueden adsorber a la sal de aluminio). Más en general, los adyuvantes que pueden utilizarse en composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a, los ya enumerados en la Referencia 5. Estos incluyen adyuvantes que contienen minerales y emulsiones de aceite en agua.

Adyuvantes que contienen minerales

55 Los adyuvantes que contienen minerales incluyen sales minerales tal como sales de aluminio y sales de calcio (o mezclas de las mismas). Preferentemente, la composición contiene un adyuvante de sal de aluminio. Las sales de aluminio incluyen hidróxidos, fosfatos, etc., en las que las sales toman cualquier forma adecuada (por ejemplo, gel,

crystalina, amorfa, etc.). Las sales de calcio incluyen fosfato de calcio (por ejemplo, las partículas "CAP" desveladas en la Ref. 17). Se prefiere la adsorción de estas sales (por ejemplo, todos los antígenos se pueden adsorber). Las composiciones que contienen minerales también pueden formularse como una partícula de sal de metal [18].

Se pueden utilizar los adyuvantes conocidos como hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio. Estos nombres son convencionales, pero se utilizan solamente por propósitos de conveniencia, como tampoco es una descripción precisa del compuesto químico real que está presente (por ejemplo, véase el capítulo 9 de la Referencia 19)). La presente invención puede utilizar cualquiera de los adyuvantes "fosfato" o "hidróxido" que son de uso general como adyuvantes. Los adyuvantes conocidos como "hidróxido de aluminio" son típicamente sales de oxihidróxido de aluminio, que son por lo general al menos parcialmente cristalinas. Los adyuvantes conocidos como "fosfato de aluminio" son típicamente hidroxifosfatos de aluminio, a menudo también contienen una pequeña cantidad de sulfato (es decir, hidroxifosfato sulfato de aluminio). Pueden obtenerse por precipitación, y las condiciones de reacción y concentraciones durante la precipitación influyen en el grado de sustitución de fosfato por hidroxilo en la sal.

Una morfología fibrosa (por ejemplo, como se observa en micrografías por transmisión electrónica) es típica de los adyuvantes de hidróxido de aluminio. El pH de los adyuvantes de hidróxido de aluminio es típicamente de aproximadamente 11, es decir, el adyuvante en sí tiene una carga superficial positiva en pH fisiológico. Se han informado capacidades de adsorción entre 1,8-2,6 mg de proteína por mg de Al^{+++} a pH 7,4 para los adyuvantes de hidróxido de aluminio.

Los adyuvantes de fosfato de aluminio tienen generalmente una relación molar PO_4/Al entre 0,3 y 1,2, preferentemente entre 0,8 y 1,2, y más preferentemente $0,95 \pm 0,1$. El fosfato de aluminio generalmente es amorfo, en particular para las sales de hidroxifosfato. Un adyuvante típico es hidroxifosfato de aluminio amorfo con una relación molar PO_4/Al entre 0,84 y 0,92, incluida en 0,6 mg de Al^{3+}/ml . El fosfato de aluminio está generalmente en partículas (por ejemplo, morfología en forma de placa observada en micrografías por transmisión electrónica). Los diámetros típicos de las partículas están en el intervalo de 0,1-10 μm (por ejemplo, aproximadamente 0,1-5 μm) después de cualquier adsorción de antígeno. Se han informado capacidades de adsorción entre 0,7-1,5 mg de proteína por mg de Al^{+++} a pH 7,4 para los adyuvantes de fosfato de aluminio.

El punto de carga cero (PZC) de fosfato de aluminio está inversamente relacionado con el grado de sustitución de fosfato por hidroxilo, y este grado de sustitución puede variar dependiendo de las condiciones de reacción y concentración de los reactivos utilizados para preparar la sal por precipitación. El PZC también se altera por el cambio de la concentración de iones de fosfato libres en solución (más fosfato = PZC más ácido) o por la adición de un tampón tal como un tampón de histidina (hace al PZC más básico). Los fosfatos de aluminio utilizados de acuerdo con la presente invención generalmente tienen un PZC entre 4,0 y 7,0, más preferentemente entre 5 y 6,5, por ejemplo, aproximadamente 5,7.

Las suspensiones de las sales de aluminio utilizadas para preparar composiciones de la presente invención pueden contener un tampón (por ejemplo, un tampón de fosfato o histidina o Tris), pero esto no siempre es necesario. Las suspensiones son preferentemente estériles y libres de pirógenos. Una suspensión puede incluir iones de fosfato acuosos libres, por ejemplo, presentes en una concentración entre 1,0 y 20 mM, preferentemente entre 5 y 15 mM, y más preferentemente aproximadamente 10 mM. Las suspensiones pueden comprender también cloruro de sodio.

El adyuvante de sal de aluminio preferido es un adyuvante de hidróxido de aluminio.

La presente invención puede utilizar una mezcla de un hidróxido de aluminio y un fosfato de aluminio. En este caso puede haber más fosfato de aluminio que hidróxido, por ejemplo, una relación en peso de al menos 2:1 por ejemplo, $\geq 5:1$, $\geq 6:1$, $\geq 7:1$, $\geq 8:1$, $\geq 9:1$, etc.

La concentración de Al^{+++} en una composición para administración a un paciente es preferentemente menor que 10 mg/ml, por ejemplo, ≤ 5 mg/ml, ≤ 4 mg/ml, ≤ 3 mg/ml, ≤ 2 mg/ml, ≤ 1 mg/ml, etc. Un intervalo preferido está entre 0,3 y 1 mg/ml. Se prefiere un máximo de 0,85 mg/dosis.

Una sal mineral puede útilmente tener un agonista de TLR, tal como un agonista de TLR7, adsorbido a la misma (por ejemplo, véase Ref. 20). El agonista de TLR7 adsorbido es útilmente un compuesto de la fórmula (K) como se describe anteriormente.

Emulsiones de aceite y agua

Las composiciones de emulsiones de aceite adecuadas para su uso como adyuvantes en la presente invención incluyen emulsiones de aceite en agua tal como MF59 (Capítulo 10 de la Ref. 19; véase también la Ref. 21) y AS03. También se puede utilizar adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA).

Varios adyuvantes de emulsión de aceite en agua son conocidos, y típicamente incluyen al menos un aceite y al menos un tensioactivo, el aceite y tensioactivo siendo biodegradables (metabolizables) y biocompatibles. Las gotitas de aceite en la emulsión generalmente tienen un diámetro menor que 5 μm , e idealmente tienen un diámetro de submicrón, estos tamaños pequeños se consiguen con un microfluidizador para proporcionar emulsiones estables. Se prefieren gotitas con un tamaño menor que 220 nm dado que pueden someterse a esterilización por filtración.

La emulsión puede comprender aceites tal como aceites de fuente animal (como pescado) o vegetal. Las fuentes de aceites vegetales incluyen frutos secos, semillas y granos. El aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de coco y aceite de oliva, los más comúnmente disponibles, ejemplifican los aceites de frutos secos. Se puede utilizar aceite de jojoba, por ejemplo, obtenido de la semilla de jojoba. Los aceites de semillas incluyen aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, aceite de semilla de girasol, aceite de semilla de sésamo y similares. En el grupo de los granos, el aceite de maíz es el más fácilmente disponible, pero también se puede utilizar el aceite de otros granos de cereales tal como trigo, avena, centeno, arroz, teff, tritical y similares. Se pueden preparar ésteres de ácidos grasos de 6-10 carbonos de glicerol y 1,2-propanodiol, aunque no se producen de forma natural en los aceites de semillas, mediante hidrólisis, separación y esterificación de los materiales apropiados a partir de los aceites de frutos secos y semillas. Las grasas y aceites de la leche de mamífero son metabolizables y por lo tanto se pueden utilizar en la práctica de esta invención. Los procedimientos para la separación, purificación, saponificación y otros medios necesarios para obtener aceites puros de fuentes animales se conocen bien en la técnica. La mayoría de los peces contienen aceites metabolizables que pueden ser recuperados fácilmente. Por ejemplo, aceite de hígado de bacalao, aceites de hígado de tiburón, y aceite de ballena tal como esperma de ballena ejemplifican varios de los aceites de pescado que se pueden utilizar en la presente. Una serie de aceites de cadena ramificada se sintetizan bioquímicamente en unidades de isopreno de 5 carbonos y se denominan generalmente terpenoides. El aceite de hígado de tiburón contiene terpenoides insaturados ramificados conocidos como escualeno, 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno, que se prefiere particularmente en la presente. Escualano, el análogo saturado del escualeno, también es un aceite preferido. Los aceites de pescado, incluidos el escualeno y escualano, son fácilmente disponibles de fuentes comerciales o pueden obtenerse por procedimientos conocidos en la técnica. Otros aceites preferidos son los tocoferoles (véase más adelante). Se pueden utilizar mezclas de aceites.

Los tensioactivos se pueden clasificar por su 'HLB' (balance hidrófilo/lipófilo). Los tensioactivos preferidos de la invención tienen un HLB de al menos 10, preferentemente al menos 15, y más preferentemente al menos 16. La presente invención se puede utilizar con tensioactivos que incluyen, pero no se limitan a: los tensioactivos de ésteres de polioxietileno sorbitano (comúnmente denominados Tweens), especialmente polisorbato 20 y polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (EO), óxido de propileno (PO), y/u óxido de butileno (BO), comercializados bajo el nombre comercial DOWFAX™, tal como copolímeros de bloque EO/PO lineal; octoxinóles, que pueden variar en el número de repetición de grupos de etoxi (oxi-1,2-etanodilo), siendo de particular interés octoxinol-9 (Triton X-100, o t-octilfenoxipolietoxietanol); (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos tal como fosfatidilcolina (lecitina); etoxilatos de nonilfenol, tal como la serie NP de Tergitol™; éteres grasos de polioxietileno derivados de alcoholes de laurilo, cetilo, estearilo y oleilo (conocidos como tensioactivos Brij), tal como trietilenglicol monolauril éter (Brij 30); y ésteres de sorbitano (comúnmente conocidos como SPAN), tal como trioleato de sorbitano (Span 85) y monolaurato de sorbitano. Se prefieren los tensioactivos no iónicos. Los tensioactivos preferidos para incluir en la emulsión son Tween 80 (monooleato de polioxietileno sorbitano), Span 85 (trioleato de sorbitano), lecitina y Triton X-100.

Se pueden utilizar mezclas de tensioactivos, por ejemplo, mezclas de Tween 80/Span 85. Una combinación de un éster de polioxietileno sorbitano, tal como monooleato de polioxietileno sorbitano (Tween 80) y un octoxinol tal como t-octilfenoxipolietoxietanol (Triton X-100) también es adecuado. Otra combinación útil comprende laureth 9 más un éster de polioxietileno sorbitano y/o un octoxinol.

Las cantidades preferidas de tensioactivos (% en peso) son: ésteres de polioxietileno sorbitano (tal como Tween 80) 0,01 a 1%, en particular aproximadamente 0,1%; octil o nonilfenoxi polioxietanoles (tal como Triton X-100, u otros detergentes de la serie Triton) 0,001 a 0,1%, en particular 0,005 a 0,02%; éteres de polioxietileno (tal como laureth 9) 0,1 a 20%, preferentemente 0,1 a 10% y en particular 0,1 a 1% o aproximadamente 0,5%.

Los adyuvantes de emulsión preferidos tienen un tamaño de gotitas promedio de <1 µm por ejemplo ≤750nm, ≤500nm, ≤400nm, ≤300nm, ≤250nm, ≤220nm, ≤200nm, o más pequeño. Estos tamaños de gotitas pueden lograrse convenientemente mediante técnicas tal como microfluidización.

Los adyuvantes específicos de aceite en agua útiles con la presente invención incluyen, pero no se limitan a:

- Una emulsión submicrométrica de escualeno, polisorbato 80, y trioleato de sorbitano. Estos tres componentes pueden estar presentes en una relación en volumen de 10:1:1 o una relación en peso de 39:47:47. La composición de la emulsión por volumen puede ser de aproximadamente 5% de escualeno, aproximadamente 0,5% de polisorbato 80 y aproximadamente 0,5% de trioleato de sorbitano. En términos de peso, estas relaciones se convierten en 4,3% de escualeno, 0,5% de polisorbato 80 y 0,48% de trioleato de sorbitano. Este adyuvante se conoce como 'MF59' [22-24], como se describe en más detalle en el Capítulo 10 de la Ref. 25 y el Capítulo 12 de la Ref. 26. La emulsión de MF59 incluye ventajosamente iones de citrato, por ejemplo, tampón de citrato de sodio 10 mM.

- Una emulsión de escualeno, un tocoferol y polisorbato 80. La emulsión puede incluir solución salina tamponada con fosfato. También puede incluir Span 85 (por ejemplo, al 1%) y/o lecitina. Estas emulsiones pueden tener de 2 a 10% de escualeno, de 2 a 10% de tocoferol y de 0,3 a 3% de polisorbato 80, y la relación en peso de escualeno:tocopherol es preferentemente ≤1 ya que proporciona una emulsión más estable. El escualeno y polisorbato 80 pueden estar presentes en una relación de volumen de aproximadamente 5:2 o en una relación en peso de aproximadamente

- 11:5. Por lo tanto, los tres componentes (escualeno, tocoferol, polisorbato 80) pueden estar presentes en una relación en peso de 1068:1186:485 o aproximadamente 55:61:25. Una emulsión tal ('AS03') se puede hacer mediante la disolución de Tween 80 en PBS para dar una solución al 2%, después mezclando 90 ml de esta solución con una mezcla de (5 g de DL- α -tocoferol y 5 ml de escualeno), después microfluidizando la mezcla. La emulsión resultante puede tener gotitas de aceite submicrométricas, por ejemplo, con un diámetro promedio entre 100 y 250 nm, preferentemente de aproximadamente 180 nm. La emulsión también puede incluir un monofosforil lípido A 3-de-O-acilado (3d-MPL). Otra emulsión útil de este tipo puede comprender, por dosis humana, 0,5-10 mg de escualeno, 0,5 a 11 mg de tocoferol, y 0,1-4 mg de polisorbato 80 [27], por ejemplo, en las relaciones descritas anteriormente.
- Una emulsión de escualeno, un tocoferol y un detergente Triton (por ejemplo, Triton X-100). La emulsión puede también incluir un 3d-MPL (véase a continuación). La emulsión puede contener un tampón de fosfato.
 - Una emulsión que comprende un polisorbato (por ejemplo, polisorbato 80), un detergente Triton (por ejemplo, Triton X-100) y un tocoferol (por ejemplo, un succinato de α -tocoferol). La emulsión puede incluir estos tres componentes en una relación de masa de aproximadamente 75:11:10 (por ejemplo, 750 μ g/ml de polisorbato 80, 110 μ g/ml de Triton X-100 y 100 μ g/ml de succinato de α -tocoferol), y estas concentraciones deben incluir cualquier contribución de estos componentes de antígenos. La emulsión también puede incluir escualeno. La emulsión puede también incluir un 3d-MPL (ver abajo). La fase acuosa puede contener un tampón de fosfato.
 - Una emulsión de escualeno, polisorbato 80 y poloxámero 401 ("Pluronic™ L121"). La emulsión se puede formular en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4. Esta emulsión es un vehículo de administración útil para dipéptidos de muramilo, y se ha utilizado con treonil-MDP en el adyuvante "SAF-1" [28] (0,05-1% de Thr-MDP, 5% de escualano, 2,5% de Pluronic L121 y 0,2% de polisorbato 80). También se puede utilizar sin Thr-MDP, como en el adyuvante "AF" [29] (5% de escualano, 1,25% de Pluronic L121 y 0,2% de polisorbato 80). Se prefiere microfluidización.
 - Una emulsión que comprende escualeno, un disolvente acuoso, un tensioactivo no iónico hidrófilo de éter de polioxietileno alquilo de (por ejemplo, éter de polioxietileno (12) cetosteárido) y un tensioactivo no iónico hidrófobo (por ejemplo, un éster de sorbitano o éster de manida, tal como monooleato de sorbitano o 'Span 80'). La emulsión es preferentemente termorreversible y/o al menos 90% de las gotitas de aceite (en volumen) tienen un tamaño menor que 200 nm [30]. La emulsión también puede incluir uno o más de: alditol; un agente crioprotector (por ejemplo, un azúcar, tal como dodecilmaltósido y/o sacarosa); y/o un alquilpoliglicósido. La emulsión puede incluir un agonista de TLR4 [31]. Tales emulsiones pueden liofilizarse.
 - Una emulsión de escualeno, poloxámero 105 y Abil-Care [32]. La concentración final (peso) de estos componentes en las vacunas con adyuvante es 5% de escualeno, 4% de poloxámero 105 (poliol pluronic) y 2% de Abil-Care 85 (Bis-PEG/PPG-16/16 PEG/PPG-16/16 dimeticona; triglicérido caprílico/cáprico).
 - Una emulsión que tiene de 0,5-50% de un aceite, 0,1-10% de un fosfolípido, y 0,05-5% de un tensioactivo no iónico. Como se describe en la Referencia 33, los componentes de fosfolípidos preferidos son fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, esfingomielina y cardiolipina. Los tamaños submicrónicos de gotita son ventajosos.
 - Una emulsión de aceite en agua submicrométrica de un aceite no metabolizable (tal como aceite mineral ligero) y al menos un tensioactivo (tal como lecitina, Tween 80 o Span 80). Se pueden incluir aditivos, tal como saponina QuilA, colesterol, un conjugado de saponina-lipófilo (tal como GPI-0100, descrito en la Referencia 34, producido por la adición de amina alifática a desacilsaponina a través del grupo carboxilo de ácido glucurónico), bromuro de dimetiliodioctadecilamonio y/o N,N-dioctadecil-N,N-bis(2-hidroxietil)propanodiamina.
 - Una emulsión en la que una saponina (por ejemplo, QuilA o QS21) y un esteroide (por ejemplo, un colesterol) están asociados como micelas helicoidales [35].
 - Una emulsión que comprende un aceite mineral, un alcohol graso etoxilado lipófilo no iónico, y un agente tensioactivo hidrófilo no iónico (por ejemplo, un etoxilado de alcohol graso y/o copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno) [36].
 - Una emulsión que comprende un aceite mineral, un alcohol graso etoxilado hidrófilo no iónico y un tensioactivo lipofílico no iónico (por ejemplo, un etoxilado de alcohol graso y/o copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno) [36].
- En algunas realizaciones una emulsión puede mezclarse con antígeno extemporáneamente, en el momento de la entrega, y, por lo tanto, el adyuvante y el antígeno se pueden mantener por separado en una composición envasada o distribuida, preparada para la formulación final en el momento de uso. En otras realizaciones una emulsión se mezcla con el antígeno durante la fabricación, y, por lo tanto, la composición se envasa en una forma con adyuvante líquido. El antígeno está generalmente en una forma acuosa, tal que la composición finalmente se prepara mezclando dos líquidos. La relación de volumen de los dos líquidos para mezclar puede variar (por ejemplo, entre 5: 1 y 1: 5), pero es generalmente de aproximadamente 1:1. Cuando se dan concentraciones de componentes en las descripciones

anteriores de emulsiones específicas, estas concentraciones son típicamente para una composición sin diluir, y la concentración después de la mezcla con una solución de antígeno por lo tanto disminuye.

5 Cuando una composición incluye un tocoferol, se pueden utilizar cualquiera de los tocoferoles α , β , γ , δ , ϵ o ξ , pero los α -tocóferoles son los preferidos. El tocoferol puede tomar varias formas, por ejemplo, diferentes sales y/o isómeros. Las sales incluyen sales orgánicas, tal como succinato, acetato, nicotinato, etc. Se puede utilizar D- α -tocóferol y DL- α -tocóferol. Los tocoferoles ventajosamente se incluyen en composiciones para uso en pacientes de edad avanzada (por ejemplo, mayores de 60 años de edad o más) dado que se ha informado que la vitamina E tiene un efecto positivo sobre la respuesta inmune en este grupo de pacientes [37]. También tienen propiedades antioxidantes que pueden ayudar a estabilizar las emulsiones [38]. Un α -tocóferol preferido es DL- α -tocóferol, y la sal preferida de este tocoferol es el succinato.

10 El uso de un hidróxido de aluminio y/o adyuvante de fosfato de aluminio es particularmente preferido, y los antígenos son generalmente adsorbidos a estas sales.

15 Las composiciones de la presente invención pueden provocar una respuesta inmune mediada por células así como una respuesta inmune humoral. Esta respuesta inmune preferentemente induce anticuerpos de larga duración (por ejemplo, neutralizantes) y una inmunidad mediada por células que puede responder rápidamente tras la exposición a *S. aureus*.

La respuesta inmune puede ser una o ambas de una respuesta inmune TH1 y una respuesta TH2. Preferentemente, la respuesta inmune proporciona una o ambas de una respuesta TH1 mejorada y una respuesta TH2 mejorada.

20 La respuesta inmune mejorada puede ser una o ambas de una respuesta inmune sistémica y una de la mucosa. Preferentemente, la respuesta inmune proporciona una o ambas de una respuesta inmune sistémica mejorada y una respuesta inmune de la mucosa mejorada. Preferentemente, la respuesta inmune de la mucosa es una respuesta inmune TH2. Preferentemente, la respuesta inmune de la mucosa incluye un aumento en la producción de IgA.

25 Las infecciones por *S. aureus* pueden afectar a diversas áreas del cuerpo y, por lo tanto, las composiciones de la presente invención pueden prepararse en diversas formas. Por ejemplo, las composiciones pueden prepararse como inyectables, como soluciones o suspensiones líquidas. También se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección (por ejemplo, una composición liofilizada o una composición seca por congelación por pulverización). La composición puede prepararse para administración tópica, por ejemplo, como un ungüento, crema o polvo. La composición puede prepararse para administración oral, por ejemplo, como un comprimido o cápsula, como un pulverizador, o como un jarabe (opcionalmente aromatizado). La composición puede prepararse para administración pulmonar, por ejemplo, como un inhalador, usando un polvo fino o un pulverizador. La composición puede prepararse como un supositorio o pesario. La composición puede prepararse para administración nasal, aural u ocular, por ejemplo, en forma de gotas. La composición puede estar en forma de kit, diseñada de tal manera que una composición combinada se reconstituye inmediatamente antes de la administración a un paciente. Tales kits pueden comprender uno o más antígenos en forma líquida y uno o más antígenos liofilizados.

35 Cuando una composición se va a preparar extemporáneamente antes de su uso (por ejemplo, cuando un componente se presenta en forma liofilizada) y se presenta como un kit, el kit puede comprender dos viales, o puede comprender una jeringa ya llena y un vial, con el contenido de la jeringa utilizado para reactivar los contenidos del vial antes de la inyección.

40 Las composiciones inmunogénicas utilizadas como vacunas comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de antígeno, así como cualquier otro componente, según sea necesario. 'Cantidad inmunológicamente eficaz', quiere decir que la administración de esa cantidad a un individuo, en una dosis única o como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento o prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y condición física del individuo a tratar, la edad, el grupo taxonómico del individuo a tratar (por ejemplo, primate no humano, primate, etc.), la capacidad del sistema inmune del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la evaluación del médico tratante de la situación médica, y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad caiga en un intervalo relativamente amplio que puede determinarse mediante ensayos rutinarios. Cuando se incluye más de un antígeno en una composición, entonces dos antígenos pueden estar presentes en la misma dosis o en diferentes dosis.

50 Como se mencionó anteriormente, una composición puede incluir un agente protector de la temperatura, y este componente puede ser particularmente útil en las composiciones de adyuvante (particularmente las que contienen un adyuvante mineral, tal como una sal de aluminio). Como se describe en la Referencia 39, un agente protector de la temperatura líquido se puede añadir a una composición de vacuna acuosa para reducir su punto de congelación, por ejemplo, para reducir el punto de congelación hasta por debajo de 0 ° C. Por lo tanto, la composición se puede almacenar por debajo de 0 ° C, pero por encima de su punto de congelación, para inhibir la descomposición térmica. El agente protector de la temperatura también permite la congelación de la composición mientras protege los adyuvantes de sal mineral contra la aglomeración o sedimentación después de la congelación y descongelación, y también puede proteger la composición a temperaturas elevadas, por ejemplo, por encima de 40 ° C. Una vacuna

acuosa de partida y el agente protector de la temperatura líquido se pueden mezclar de tal manera que el agente protector de la temperatura líquido forma de 1-80% en volumen de la mezcla final. Los agentes protectores de la temperatura adecuados deben ser seguros para la administración humana, fácilmente miscibles/solubles en agua, y no deben dañar otros componentes (por ejemplo, antígeno y adyuvante) en la composición. Los ejemplos incluyen glicerina, propilenglicol, y/o polietilenglicol (PEG). Los PEG adecuados pueden tener un peso molecular promedio que oscila de 200-20000 Da. En una realización preferida, el polietilenglicol puede tener un peso molecular promedio de aproximadamente 300 Da ('PEG-300').

Procedimientos de tratamiento, y administración de la vacuna

La presente invención también proporciona un procedimiento para elevar una respuesta inmune en un mamífero, que comprende la etapa de administrar una composición de la invención al mamífero. La respuesta inmune es preferentemente protectora y preferentemente implica anticuerpos y/o inmunidad mediada por células. El procedimiento puede elevar una respuesta de refuerzo.

Al menos algunos de los anticuerpos producidos en respuesta a los polipéptidos que se administran de acuerdo con la invención deben ser protectores.

La presente invención proporciona también el uso de una forma variante de un antígeno Sta006, a condición de que la variante no contenga ningún grupo tiol libre, en la fabricación de un medicamento para elevar una respuesta inmune en un mamífero. También puede implicar el uso de un adyuvante.

Al elevar una respuesta inmune en el mamífero mediante estos usos y procedimientos, el mamífero puede estar protegido contra la infección por *S. aureus*, incluyendo una infección nosocomial. Más en particular, el mamífero puede estar protegido contra una infección de la piel, neumonía, meningitis, endocarditis osteomielitis, síndrome de choque tóxico, y/o septicemia.

La presente invención también proporciona un kit que comprende un primer componente y un segundo componente en el que ni el primer componente ni el segundo componente es una composición de la invención como se describe anteriormente, pero en el que el primer componente y el segundo componente se pueden combinar para proporcionar una composición de la invención como se describe anteriormente. El kit puede incluir además un tercer componente que comprende uno o más de los siguientes: instrucciones, jeringa u otro dispositivo de administración, adyuvante, o solución de formulación aceptable para uso farmacéutico.

La presente invención también proporciona un dispositivo de administración prellenado con una composición inmunogénica de la invención.

El mamífero es preferentemente un ser humano. Cuando la vacuna es para uso profiláctico, el ser humano es preferentemente un niño (por ejemplo, un niño pequeño o bebé) o un adolescente; cuando la vacuna es para uso terapéutico, el ser humano es preferentemente un adolescente o un adulto. Una vacuna destinada a niños también se puede administrar a adultos, por ejemplo, para evaluar la seguridad, dosificación, inmunogenicidad, etc. Otros mamíferos que pueden ser útilmente inmunizados de acuerdo con la presente invención son vacas, perros, caballos y cerdos.

Una forma de comprobar la eficacia del tratamiento terapéutico implica monitorizar la infección de *S. aureus* después de la administración de las composiciones de la presente invención. Una forma de comprobar la eficacia del tratamiento profiláctico implica monitorizar respuestas inmunes, sistémicamente (tal como monitorizar el nivel de la producción de IgG1 e IgG2a) y/o por vía mucosa (tal como monitorizar el nivel de la producción de IgA), contra los antígenos en las composiciones de la presente invención después de la administración de la composición. Típicamente, las respuestas de anticuerpos de suero específicos de antígeno se determinan después de la inmunización, pero las respuestas de anticuerpos de la mucosa antes del desafío, aunque específicas de antígeno, se determinan después de la inmunización y después de la estimulación.

Otra forma de evaluar la inmunogenicidad de las composiciones de la presente invención es expresar las proteínas de manera recombinante para el estudio de sueros o secreciones mucosas de pacientes por inmunoblot y/o micromatrices. Una reacción positiva entre la proteína y la muestra del paciente indica que el paciente ha montado una respuesta inmune a la proteína en cuestión. Este procedimiento también se puede utilizar para identificar antígenos y/o epítomos inmunodominantes dentro de antígenos.

La eficacia de las composiciones inmunogénicas también se puede determinar *in vivo*, desafiando modelos animales de infección por *S. aureus*, por ejemplo, cobayos o ratones, con las composiciones inmunogénicas. En particular, hay tres modelos animales útiles para el estudio de enfermedades infecciosas por *S. aureus*, a saber: (i) el modelo de absceso murino [40], (ii) el modelo de infección letal murino [40] y (iii) el modelo de neumonía murino [41]. El modelo de absceso observa abscesos en los riñones de ratones después del desafío intravenoso. El modelo de infección letal observa el número de ratones que sobreviven después de ser infectados por una dosis normalmente letal de *S. aureus* por vía intravenosa o intraperitoneal. El modelo de neumonía también se observa en la tasa de supervivencia, pero utiliza infección intranasal. Una composición inmunogénica útil puede ser eficaz en uno o más de estos modelos. Por ejemplo, para algunas situaciones clínicas, puede ser deseable protegerse contra la neumonía, sin necesidad de

prevenir la diseminación hemática o promover la opsonización; en otras situaciones, el deseo principal puede ser prevenir la diseminación hemática. Diferentes antígenos, y diferentes combinaciones de antígenos, pueden contribuir a los diferentes aspectos de una composición inmunogénica eficaz.

5 Las composiciones de la presente invención generalmente pueden administrarse directamente a un paciente. La administración directa puede lograrse mediante inyección parenteral (por ejemplo, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, o al espacio intersticial de un tejido), o por vía mucosa, tal como por administración rectal, oral (por ejemplo, comprimido, pulverización), vaginal, tópica, transdérmica o transcutánea, intranasal, ocular, aural, pulmonar u otra administración mucosa.

10 La presente invención puede utilizarse para provocar inmunidad sistémica y/o mucosa, preferentemente para provocar una inmunidad sistémica y/o mucosa mejorada.

Preferentemente, el aumento de la inmunidad sistémica y/o mucosa se refleja en una respuesta inmune TH1 y/o TH2 mejorada. Preferentemente, la respuesta inmune mejorada incluye un aumento en la producción de IgG1 y/o IgG2a y/o IgA.

15 La dosis puede administrarse por un programa de dosis única o un programa de dosis múltiples. Las dosis múltiples pueden utilizarse en un programa de inmunización principal y/o en un programa de inmunización de refuerzo. En un programa de dosis múltiples las diversas dosis pueden administrarse por la misma o diferentes vías, por ejemplo, una sensibilización parenteral y un refuerzo de la mucosa, una sensibilización de la mucosa y un refuerzo parenteral, etc. Las dosis múltiples se típicamente administran al menos con 1 semana de diferencia (por ejemplo, aproximadamente 20 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 16 semanas, etc.).

25 Las vacunas preparadas de acuerdo con la presente invención pueden utilizarse para tratar niños y adultos. Por lo tanto, un paciente humano puede tener menos que 1 año de edad, 1-5 años, 5-15 años, 15-55 años de edad, o al menos 55 años de edad. Los pacientes preferidos para recibir las vacunas son los ancianos (por ejemplo, ≥50 años de edad, ≥60 años de edad, y preferentemente ≥65 años), los jóvenes (por ejemplo, ≤5 años de edad), pacientes hospitalizados, trabajadores de la salud, personal de servicios armados y personal militar, mujeres embarazadas, enfermos crónicos o pacientes inmunodeficientes. Sin embargo, las vacunas no son adecuadas únicamente para estos grupos, y pueden utilizarse de manera más general en una población.

30 Las vacunas producidas por la presente invención se pueden administrar a los pacientes sustancialmente al mismo tiempo que (por ejemplo, durante la misma consulta médica o visita a un centro profesional de la salud o de vacunación) otras vacunas, por ejemplo, sustancialmente al mismo tiempo que una vacuna contra la gripe, una vacuna contra el sarampión, una vacuna contra las paperas, una vacuna contra la rubéola, una vacuna contra MMR, una vacuna contra la varicela, una vacuna contra MMRV, una vacuna contra la difteria, una vacuna contra el tétanos, una 35 vacuna contra la tos ferina, una vacuna contra DTP, una vacuna tipo b *H. influenzae* conjugada, una vacuna contra el virus de la polio inactivado, una vacuna contra el virus de la hepatitis B, una vacuna conjugada meningocócica (tal como una vacuna AC-W135-Y tetravalente), una vacuna contra el virus respiratorio sincitial, etc. Otras vacunas no estafilocócicas adecuadas para la administración conjunta pueden incluir uno o más antígenos enumerados en las páginas 33-46 de la Referencia 15.

General

40 La práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, procedimientos convencionales de química, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, las Referencias 42-49, etc.

45 Anteriormente se utiliza la numeración "GI". Un número GI, o "GenInfo Identifier", es una serie de dígitos asignados consecutivamente a cada registro de secuencia procesado por NCBI cuando se añaden secuencias a sus bases de datos. El número GI no tiene semejanza con el número de acceso del registro de secuencia. Cuando se actualiza una secuencia (por ejemplo, para corrección, o para añadir más anotación o información), entonces se recibe un nuevo número de GI. Por lo tanto, la secuencia asociada con un número GI dado no se cambia nunca.

50 Cuando la presente invención se refiere a un "epítipo", este epítipo puede ser un epítipo de células B y/o un epítipo de células T. Tales epítipos se pueden identificar empíricamente (por ejemplo, usando PEPSCAN [50,51] o procedimientos similares), o pueden predecirse (por ejemplo, utilizando el índice antigénico de Jameson-Wolf [52], enfoques basados en la matriz [53], MAPITOPe [54], TEPITOPe [55,56], redes neuronales [57], OptiMer & EpiMer [58, 59], ADEPT [60], Tsites [61], hidrofiliidad [62], índice antigénico [63] o los procedimientos desvelados en las Referencias 64-68, etc.). Los epítipos son las partes de un antígeno que son reconocidas por y se unen a los sitios de anticuerpos o receptores de células T de unión a antígeno, y también pueden denominarse "determinantes 55 antigénicos".

Cuando se omite un "dominio" antígeno, esto puede implicar la omisión de un péptido señal, de un dominio citoplásmico, de un dominio transmembrana, de un dominio extracelular, etc.

El término "que comprende" abarca "que incluye" así como "que consiste en", por ejemplo, una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico x es opcional y significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

5 Las referencias a un porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos significan que, cuando se alinean, ese porcentaje de aminoácidos es el mismo al comparar las dos secuencias. Esta alineación y el porcentaje de homología o identidad de secuencia pueden determinarse usando programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos en la sección 7.7.18 de la Ref. 69. Una alineación preferida se determina por el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman usando una búsqueda de espacios en blanco afines con una penalización de apertura de espacios en blanco de 12 y una penalización de extensión de espacios en blanco de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman se desvela en la Ref. 70. El porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias de diferentes longitudes se calcula preferentemente sobre la longitud de la secuencia más larga.

15 Los adyuvantes que contienen fósforo utilizados con la presente invención pueden existir en un número de formas protonadas y desprotonadas en función del pH del ambiente circundante, por ejemplo, el pH del disolvente en el que se disuelven. Por lo tanto, aunque puede ilustrarse una forma particular, se pretende que estos ejemplos sean meramente representativos y no limitantes a una forma protonada o desprotonada específica. Por ejemplo, en el caso de un grupo de fosfato, se ha ilustrado como $-\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$, pero la definición incluye las formas protonadas $[\text{OP}(\text{O})(\text{OH}_2)(\text{OH})]^+$ y $[\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2]^{2+}$ que pueden existir en condiciones ácidas y las formas desprotonadas $[\text{OP}(\text{O})(\text{OH})(\text{O})]^-$ y $[\text{OP}(\text{O})(\text{O})_2]^{2-}$ que pueden existir en condiciones básicas.

20 Los compuestos pueden existir como sales aceptables para uso farmacéutico. Por lo tanto, los compuestos (por ejemplo, adyuvantes) pueden utilizarse en forma de sus sales aceptables para uso farmacéutico, es decir, sales tolerables fisiológicamente o toxicológicamente (que incluyen, cuando es adecuado, sales de adición de base aceptables para uso farmacéutico y sales de adición de ácido aceptables para uso farmacéutico).

25 El término "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo, una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, el término "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la presente invención.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra las curvas de fusión normalizadas de los antígenos Sta006 que contienen cisteína y deficientes de cisteína.

30 La Figura 2 muestra el perfil de cromatografía de exclusión por tamaño (RP-HPLC) de antígeno Cys(-)Sta006 después de 4 semanas de almacenamiento a 37 ° C. El perfil de RP-HPLC de antígeno Cys(-)Sta006 sin haber experimentado condición de almacenamiento se muestra como un control. * indica un pico adicional de antígeno Cys(-)Sta006 almacenado después de 4 semanas a 37 ° C.

35 La Figura 3 muestra los títulos de anticuerpos anti-Sta006 en ratones CD1 que se han inmunizado con la vacuna que contiene antígeno Cys(+)Sta006 o antígeno Cys(-)Sta006. También se muestran datos de inmunogenicidad para el grupo de control.

Modos para llevar a cabo la presente invención

Ensayo de desnaturalización térmica

40 El antígeno Cys(+) Sta006 utilizado en los experimentos descritos a continuación se representa por la SEQ ID NO:3, y el antígeno Cys(-) Sta006 se representa por la SEQ ID NO:6. Ambos antígenos eran proteínas recombinantes purificadas de *E. coli*.

45 La estabilidad térmica del antígeno Cys(+) contiene cisteína Sta006 se comparó con el antígeno Cys(-) deficiente de cistina Sta006 del Fluorimetría Diferencial de Barrido (DSF). Las muestras que contenían antígeno (10 μM en PBS) se calentaron bajo condiciones controladas con una tasa de rampa de 1°C/min en el instrumento PCR en Tiempo Real Mx3000P Strategen. Se utilizó el colorante SyproOrange 5x, y se monitorizaron los cambios en la fluorescencia. Los ensayos se realizaron en un intervalo de temperatura de 10-100 ° C.

50 La Figura 1 informa las curvas de fusión de los antígenos probados. Se muestra que el pico para el antígeno Cys(-) se desplaza ligeramente hacia la parte superior e izquierda en comparación con el antígeno Cys(+). Las temperaturas de fusión (T_m) se determinaron mediante el ajuste de la primera derivada de la curva experimental. La T_m de antígeno Cys(+) Sta006 era de 50,16°C, y la T_m de antígeno Cys(-) Sta006 era de 49,62°C.

Por lo tanto, el perfil de estabilidad térmica del antígeno Cys(-) Sta006 es comparable al antígeno Cys(+) Sta006. La modificación del antígeno mediante la supresión o sustitución del residuo de cisteína no tiene un impacto significativo en la estabilidad térmica del antígeno Sta006.

Procedimiento de purificación

Las etapas de purificación para el antígeno Sta006 Cys (+) se explican a continuación.

1. Lisis y clarificación - lisis celular y clarificación; la adición de un agente floculante (PEI) que reduce el ADN, endotoxinas e impurezas proteicas.
- 5 2. Cromatografía SPFF - eliminación de HCP y otras impurezas.
3. Reacción de dimerización oxidativa - etapa de oxidación.
4. Cromatografía de cHT - eliminación de HCP y otras impurezas residuales y separación de monómero del dímero.
5. Diafiltración final de 10 kDa - diafiltración en un tampón final.
- 10 Para purificar Cys(-) Sta006, la etapa de reacción de dimerización oxidativa ya no era necesaria dado que el antígeno se puede purificar como un monómero. La etapa de cromatografía de cHT también se simplifica dado ya no era necesario separar el monómero del dímero.

Se determinaron la pureza y rendimiento de los antígenos Cys(-) y Cys(+) Sta006 obtenidos a partir del procedimiento explicado con anterioridad, y los resultados se muestran en la Tabla 1. La pureza se determina usando detector PDA 214 nm. El rendimiento se calcula por: proteínas totales (contenido de mBCA (mg/ml)) x pureza (RPC (%) 214 nm).

Tabla 1: Pureza y rendimiento de los antígenos Cys(-) y Cys(+).

Antígeno	¿Cys?	Pureza RP (%)	Rendimiento (g/l ferm)
Sta006	Cys(-)	90,1	0,091
			La biomasa de la fermentación recuperada fue de aproximadamente 54% (rendimiento teórico sin suspensión de la pérdida de centrifugación fue de: 1,176 g/l ferm)
	Cys(+)	95,8	0,012

El antígeno Cys(-) Sta006 purificado tenía pureza y rendimiento comparable al antígeno Cys(+) Sta006. El panel de análisis se ajustaba a los límites de especificación internos. La eliminación de cisteína permitió una mayor flexibilidad en el procedimiento de purificación del antígeno Sta006. El procedimiento de purificación se puede optimizar en forma adicional con el fin de mejorar la pureza y el rendimiento.

Evaluación de estabilidad

La estabilidad de antígeno Cys(-) Sta006 se investigó en una combinación de vacuna con base en la divulgación de la Referencia 5. El antígeno estaba presente a una concentración de 72 µg/ml. La combinación de la vacuna se expuso a temperaturas: 2-8°C, 15°C, 25°C y 37°C durante 0 a 4 semanas. La temperatura más alta probada (37°C) estaba por debajo de la Tm del antígeno Cys(-) Sta006 (aproximadamente 50°C). Por lo tanto, la inestabilidad de proteínas impulsada por el despliegue de la proteína no era un factor influyente en este experimento.

Las muestras se analizaron mediante RP-HPLC, y también se analizaron el pH y la osmolalidad (3 determinaciones en 3 viales diferentes a cada temperatura y punto de tiempo). La osmolalidad y el pH se mantuvieron constantes en el tiempo y dentro del intervalo aceptable. El antígeno Cys(-) Sta006 es estable cuando se almacena durante 4 semanas a 2-8°C, 15°C y 25°C. Sin embargo, cuando se almacena durante 4 semanas a 37 ° C, se observa una pérdida de 20-30% de antígeno. La Figura 2 muestra que el perfil de SEC de antígeno Cys(-) Sta006 almacenado después de 4 semanas a 37 ° C tiene un pequeño pico adicional (*), lo que sugiere la presencia de productos de

degradación. El área del pico adicional sobre el área total es de 2,9%. Por lo tanto, el antígeno Cys(-) Sta006 es estable durante hasta 4 semanas a 2-8°C, 15°C y 25°C.

La estabilidad de Cys(-) Sta006 también se evaluó con adyuvante de hidróxido de aluminio. Se observó que el antígeno Cys(-) Sta006 se adsorbe completamente sobre Alum con adsorción >96%. No se revelaron picos adicionales en las muestras desorbidas en cualquier condición probada. Para la desorción, las muestras se trataron con 300 mM de KH₂PO₄ pH 6,8 durante la noche a 25°C. Las mismas condiciones se aplican para el tratamiento de la muestra en todos los puntos de tiempo (suposición: no hay influencia del envejecimiento de la formulación).

Estudios de inmunogenicidad en ratones

La inmunogenicidad del antígeno Cys(+) Sta006 se comparó con el antígeno Cys(-) Sta006. Los antígenos se utilizaron en una combinación con base en la divulgación de la Referencia 5.

Ratones CD1 de cinco semanas de edad fueron inmunizados por vía intraperitoneal con una inyección de sensibilización-refuerzo con las vacunas en intervalos de 14 días. Los animales se sangraron inmediatamente antes de la primera inmunización y 23 días después, y los sueros fueron examinados para anticuerpos IgG dirigidos contra las proteínas purificadas utilizando la tecnología Luminex. La lectura del ensayo es una medida de la intensidad de fluorescencia expresada como Unidades de Luminex Relativas arbitraria (RLU/ml).

La Figura 3 informa títulos de anticuerpos de los ratones después de la inmunización. Los títulos de anticuerpos para el antígeno Sta006 no difieren significativamente entre el antígeno Cys(+) que contiene cisteína Sta006 y la variante Cys(-) deficiente de cisteína Sta006.

En un estudio adicional, se compararon vacunas monovalentes que contienen antígenos Cys(-) Sta006 Cys(+) Sta006. Las vacunas se potenciaron con adyuvante de hidróxido de aluminio. Cada vacuna contiene 30 mg de antígeno e hidróxido de aluminio a 2 mg/ml.

Dieciséis ratones CD1 (de cinco semanas de edad) se inmunizaron por vía subcutánea tres veces (en t = 0, 14 y 28 días). Los animales se sangraron inmediatamente antes de la primera inmunización, y 13, 27 y 42 días después de la primera inmunización. Los sueros se examinaron en busca de anticuerpos IgG dirigidos contra las proteínas purificadas utilizando la tecnología Luminex. La lectura del ensayo es una medida de la intensidad de fluorescencia expresada como Unidades de Luminex Relativas arbitraria (RLU/ml).

Se descubrió que los anticuerpos se indujeron específicamente por vacunas monovalentes que contienen los antígenos Cys(-) y Cys(+) correspondientes. No existen diferencias significativas entre las vacunas monovalentes Cys(-) Sta006 y Cys(+) Sta006.

Referencias

- [1] Harro et al. (2010) Clin Vaccine Immunol 17:1868-74.
- [2] Kuklin et al. (2006) Infect Immun. 74(4):2215-23.
- [3] Sheridan (2009) Nature Biotechnology 27:499-501.
- [4] Merck and Intercell AG Announce Termination of Phase II/III Clinical Trial of Investigational Staphylococcus aureus Vaccine, V710 - Merck Research and Development News - 8 June 2011.
- [5] WO2010/119343.
- [6] Solicitud Provisoria de los Estados Unidos Núm. 61/580191.
- [7] Sebulsky & Heinrichs (2001) J Bacteriol 183:4994-5000.
- [8] Sebulsky et al. (2003) J Biol Chem 278:49890-900.
- [9] Protective Groups in organic synthesis, Third Edition, Theodora W Greene, Peter G M Wuts, (1999) John Wiley, Chapter 6 Protection for the Thiol Group.
- [10] Kuroda et al. (2001) Lancet 357:1225-1240.
- [13] Needleman & Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453.
- [14] Rice et al. (2000) Trends Genet 16:276-277.
- [15] Documento WO2008/019162.
- [16] Documento WO2011/027222.

- [17] Patente de los Estados Unidos Núm. 6.355.271.
- [18] Documento WO00/23105.
- [19] Vaccine Design (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
- [20] Documento WO2011/027222.
- 5 [21] Documento WO90/14837.
- [22] Documento WO90/14837.
- [23] Podda & Del Giudice (2003) Expert Rev Vaccines 2:197-203.
- [24] Podda (2001) Vaccine 19: 2673-2680.
- 10 [25] Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
- [26] Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Volume 42 of Methods in Molecular Medicine series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
- [27] Documento WO2008/043774.
- [28] Allison & Byars (1992) Res Immunol 143:519-25.
- 15 [29] Hariharan et al. (1995) Cancer Res 55:3486-9.
- [30] Documento US-2007/014805.
- [31] Documento US-2007/0191314.
- [32] Suli et al. (2004) Vaccine 22(25-26):3464-9.
- [33] Documento WO95/11700.
- 20 [34] Patente de los Estados Unidos Núm. 6.080.725.
- [35] Documento WO2005/097181.
- [36] Documento WO2006/113373.
- [37] Han et al. (2005) Impact of Vitamin E on Immune Function and Infectious Diseases in the Aged at Nutrition, Immune functions and Health EuroConference, Paris, 9-10 June 2005.
- 25 [38] Documento US-6630161.
- [39] Documento WO2006/110603.
- [40] Stranger-Jones et al. (2006) PNAS USA 103:16942-7.
- [41] Wardenburg et al. (2007) Infect Immun 75:1040-4.
- [42] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20th edition, ISBN: 0683306472.
- 30 [43] Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
- [44] Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)
- [45] Sambrook et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- 35 [46] Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
- [47] Ausubel et al. (eds) (2002) Short protocols in molecular biology, 5th edition (Current Protocols).
- [48] Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, (Ream et al., eds., 1998, Academic Press)
- [49] PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2nd ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)

- [50] Geysen et al. (1984) PNAS USA 81:3998-4002.
- [51] Carter (1994) Methods Mol Biol 36:207-23.
- [52] Jameson, BA et al. 1988, CABIOS 4(1):181-186.
- [53] Raddrizzani & Hammer (2000) Brief Bioinform 1(2): 179-89.
- 5 [54] Bublil et al. (2007) Proteins 68(1):294-304.
- [55] De Lalla et al. (1999) J. Immunol. 163:1725-29.
- [56] Kwok et al. (2001) Trends Immunol 22:583-88.
- [57] Brusica et al. (1998) Bioinformatics 14(2):121-30
- [58] Meister et al. (1995) Vaccine 13(6):581-91.
- 10 [59] Roberts et al. (1996) AIDS Res Hum Retroviruses 12(7):593-610.
- [60] Maksyutov & Zagrebelnaya (1993) Comput Appl Biosci 9(3):291-7.
- [61] Feller & de la Cruz (1991) Nature 349(6311):720-1.
- [62] Hopp (1993) Peptide Research 6:183-190.
- [63] Welling et al. (1985) FEBS Lett. 188:215-218.
- 15 [64] Davenport et al. (1995) Immunogenetics 42:392-297.
- [65] Tsurui & Takahashi (2007) J Pharmacol Sci. 105(4):299-316.
- [66] Tong et al. (2007) Brief Bioinform. 8(2):96-108.
- [67] Schirle et al. (2001) J Immunol Methods. 257(1-2):1-16.
- [68] Chen et al. (2007) Amino Acids 33(3):423-8.
- 20 [69] Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987) Supplement 30
- [70] Smith & Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482-489.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 25 <110> Novartis AG
- <120> Proteínas estabilizadas para inmunización contra Staphylococcus aureus
- <130> PAT055151-WO-PCT
- <140> PCT/EP2013/
- <141> 08/29/2013
- 30 <150> US61/695723
- <151> 2012-08-31
- <160> 7
- <170> SeqWin2010, versión 1.0
- <210> 1
- 35 <211> 302
- <212> PRT
- <213> Staphylococcus aureus

<400> 1

```

Met Lys Lys Leu Leu Leu Pro Leu Ile Ile Met Leu Leu Val Leu Ala
1      5      10
Ala Cys Gly Asn Gln Gly Glu Lys Asn Asn Lys Ala Glu Thr Lys Ser
20      25      30
Tyr Lys Met Asp Asp Gly Lys Thr Val Asp Ile Pro Lys Asp Pro Lys
35      40      45
Arg Ile Ala Val Val Ala Pro Thr Tyr Ala Gly Gly Leu Lys Lys Leu
50      55      60
Gly Ala Asn Ile Val Ala Val Asn Gln Gln Val Asp Gln Ser Lys Val
65      70      75      80
Leu Lys Asp Lys Phe Lys Gly Val Thr Lys Ile Gly Asp Gly Asp Val
85      90      95
Glu Lys Val Ala Lys Glu Lys Pro Asp Leu Ile Ile Val Tyr Ser Thr
100     105     110
Asp Lys Asp Ile Lys Lys Tyr Gln Lys Val Ala Pro Thr Val Val Val
115     120     125
Asp Tyr Asn Lys His Lys Tyr Leu Glu Gln Gln Glu Met Leu Gly Lys
130     135     140
Ile Val Gly Lys Glu Asp Lys Val Lys Ala Trp Lys Lys Asp Trp Glu
145     150     155     160
Glu Thr Thr Ala Lys Asp Gly Lys Glu Ile Lys Lys Ala Ile Gly Gln
165     170     175
Asp Ala Thr Val Ser Leu Phe Asp Glu Phe Asp Lys Lys Leu Tyr Thr
180     185     190
Tyr Gly Asp Asn Trp Gly Arg Gly Gly Glu Val Leu Tyr Gln Ala Phe
195     200     205
Gly Leu Lys Met Gln Pro Glu Gln Gln Lys Leu Thr Ala Lys Ala Gly
210     215     220
Trp Ala Glu Val Lys Gln Glu Glu Ile Glu Lys Tyr Ala Gly Asp Tyr
225     230     235     240
Ile Val Ser Thr Ser Glu Gly Lys Pro Thr Pro Gly Tyr Glu Ser Thr
245     250     255
Asn Met Trp Lys Asn Leu Lys Ala Thr Lys Glu Gly His Ile Val Lys
260     265     270
Val Asp Ala Gly Thr Tyr Trp Tyr Asn Asp Pro Tyr Thr Leu Asp Phe
275     280     285
Met Arg Lys Asp Leu Lys Glu Lys Leu Ile Lys Ala Ala Lys
290     295     300

```

5 <210> 2

<211> 285

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 2

```

Cys Gly Asn Gln Gly Glu Lys Asn Asn Lys Ala Glu Thr Lys Ser Tyr
1           5           10           15

Lys Met Asp Asp Gly Lys Thr Val Asp Ile Pro Lys Asp Pro Lys Arg
20          25          30

Ile Ala Val Val Ala Pro Thr Tyr Ala Gly Gly Leu Lys Lys Leu Gly
35          40          45

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

Lys Asp Lys Phe Lys Gly Val Thr Lys Ile Gly Asp Gly Asp Val Glu
65          70          75          80

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

Lys Asp Ile Lys Lys Tyr Gln Lys Val Ala Pro Thr Val Val Val Asp
100         105         110

Tyr Asn Lys His Lys Tyr Leu Glu Gln Gln Glu Met Leu Gly Lys Ile
115        120        125

Val Gly Lys Glu Asp Lys Val Lys Ala Trp Lys Lys Asp Trp Glu Glu
130        135        140

Thr Thr Ala Lys Asp Gly Lys Glu Ile Lys Lys Ala Ile Gly Gln Asp
145        150        155        160

Ala Thr Val Ser Leu Phe Asp Glu Phe Asp Lys Lys Leu Tyr Thr Tyr
165        170        175

Gly Asp Asn Trp Gly Arg Gly Gly Glu Val Leu Tyr Gln Ala Phe Gly
180        185        190

Leu Lys Met Gln Pro Glu Gln Gln Lys Leu Thr Ala Lys Ala Gly Trp
195        200        205

Ala Glu Val Lys Gln Glu Glu Ile Glu Lys Tyr Ala Gly Asp Tyr Ile
210        215        220

Val Ser Thr Ser Glu Gly Lys Pro Thr Pro Gly Tyr Glu Ser Thr Asn
225        230        235        240

Met Trp Lys Asn Leu Lys Ala Thr Lys Glu Gly His Ile Val Lys Val
245        250        255

Asp Ala Gly Thr Tyr Trp Tyr Asn Asp Pro Tyr Thr Leu Asp Phe Met
260        265        270

Arg Lys Asp Leu Lys Glu Lys Leu Ile Lys Ala Ala Lys
275        280        285

```

<210> 3

<211> 288

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Variante de la proteína Staphylococcus aureus

<400> 3

```

Met Ala Ser Cys Gly Asn Gln Gly Glu Lys Asn Asn Lys Ala Glu Thr
 1          5          10          15

Lys Ser Tyr Lys Met Asp Asp Gly Lys Thr Val Asp Ile Pro Lys Asp
20          25          30

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

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

Lys Val Leu Lys Asp Lys Phe Lys Gly Val Thr Lys Ile Gly Asp Gly
65          70          75          80

Asp Val Glu Lys Val Ala Lys Glu Lys Pro Asp Leu Ile Ile Val Tyr
85          90          95

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

Val Val Asp Tyr Asn Lys His Lys Tyr Leu Glu Gln Gln Glu Met Leu
115         120         125

Gly Lys Ile Val Gly Lys Glu Asp Lys Val Lys Ala Trp Lys Lys Asp
130         135         140

Trp Glu Glu Thr Thr Ala Lys Asp Gly Lys Glu Ile Lys Lys Ala Ile
145         150         155         160

Gly Gln Asp Ala Thr Val Ser Leu Phe Asp Glu Phe Asp Lys Lys Leu
165         170         175

Tyr Thr Tyr Gly Asp Asn Trp Gly Arg Gly Gly Glu Val Leu Tyr Gln
180         185         190

Ala Phe Gly Leu Lys Met Gln Pro Glu Gln Gln Lys Leu Thr Ala Lys
195         200         205

Ala Gly Trp Ala Glu Val Lys Gln Glu Glu Ile Glu Lys Tyr Ala Gly
210         215         220

Asp Tyr Ile Val Ser Thr Ser Glu Gly Lys Pro Thr Pro Gly Tyr Glu
225         230         235         240

Ser Thr Asn Met Trp Lys Asn Leu Lys Ala Thr Lys Glu Gly His Ile
245         250         255

Val Lys Val Asp Ala Gly Thr Tyr Trp Tyr Asn Asp Pro Tyr Thr Leu
260         265         270

Asp Phe Met Arg Lys Asp Leu Lys Glu Lys Leu Ile Lys Ala Ala Lys
275         280         285

```

<210> 4

<211> 284

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Variante de la proteína Staphylococcus aureus

<400> 4

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

Glu	Val	Lys	Gln	Glu	Glu	Ile	Glu	Lys	Tyr	Ala	Gly	Asp	Tyr	Ile	Val
210						215					220				
Ser	Thr	Ser	Glu	Gly	Lys	Pro	Thr	Pro	Gly	Tyr	Glu	Ser	Thr	Asn	Met
225					230					235					240
Trp	Lys	Asn	Leu	Lys	Ala	Thr	Lys	Glu	Gly	His	Ile	Val	Lys	Val	Asp
				245					250					255	
Ala	Gly	Thr	Tyr	Trp	Tyr	Asn	Asp	Pro	Tyr	Thr	Leu	Asp	Phe	Met	Arg
			260					265					270		
Lys	Asp	Leu	Lys	Glu	Lys	Leu	Ile	Lys	Ala	Ala	Lys				
	275						280								

<210> 5

<211> 285

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Variante de la proteína Staphylococcus aureus

<220>

<221> Xaa

10 <222> 1

<223> Cualquier aminoácido que no contenga un grupo tiol libre.

<400> 5

```

Xaa Gly Asn Gln Gly Glu Lys Asn Asn Lys Ala Glu Thr Lys Ser Tyr
1      5      10      15

Lys Met Asp Asp Gly Lys Thr Val Asp Ile Pro Lys Asp Pro Lys Arg
20      25      30

Ile Ala Val Val Ala Pro Thr Tyr Ala Gly Gly Leu Lys Lys Leu Gly
35      40      45

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

Lys Asp Lys Phe Lys Gly Val Thr Lys Ile Gly Asp Gly Asp Val Glu
65      70      75      80

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

Lys Asp Ile Lys Lys Tyr Gln Lys Val Ala Pro Thr Val Val Val Asp
100     105     110

Tyr Asn Lys His Lys Tyr Leu Glu Gln Gln Glu Met Leu Gly Lys Ile
115     120     125

Val Gly Lys Glu Asp Lys Val Lys Ala Trp Lys Lys Asp Trp Glu Glu
130     135     140

Thr Thr Ala Lys Asp Gly Lys Glu Ile Lys Lys Ala Ile Gly Gln Asp
145     150     155     160

Ala Thr Val Ser Leu Phe Asp Glu Phe Asp Lys Lys Leu Tyr Thr Tyr
165     170     175

Gly Asp Asn Trp Gly Arg Gly Gly Glu Val Leu Tyr Gln Ala Phe Gly
180     185     190

Leu Lys Met Gln Pro Glu Gln Gln Lys Leu Thr Ala Lys Ala Gly Trp
195     200     205

Ala Glu Val Lys Gln Glu Glu Ile Glu Lys Tyr Ala Gly Asp Tyr Ile
210     215     220

Val Ser Thr Ser Glu Gly Lys Pro Thr Pro Gly Tyr Glu Ser Thr Asn
225     230     235     240

Met Trp Lys Asn Leu Lys Ala Thr Lys Glu Gly His Ile Val Lys Val
245     250     255

Asp Ala Gly Thr Tyr Trp Tyr Asn Asp Pro Tyr Thr Leu Asp Phe Met
260     265     270

Arg Lys Asp Leu Lys Glu Lys Leu Ile Lys Ala Ala Lys
275     280     285

```

<210> 6

<211> 287

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Variante de la proteína Staphylococcus aureus

<400> 6

```

Met Ala Ser Gly Asn Gln Gly Glu Lys Asn Asn Lys Ala Glu Thr Lys
1      5      10      15

Ser Tyr Lys Met Asp Asp Gly Lys Thr Val Asp Ile Pro Lys Asp Pro
      20      25      30

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

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

Val Leu Lys Asp Lys Phe Lys Gly Val Thr Lys Ile Gly Asp Gly Asp
65      70      75      80

Val Glu Lys Val Ala Lys Glu Lys Pro Asp Leu Ile Ile Val Tyr Ser
      85      90      95

Thr Asp Lys Asp Ile Lys Lys Tyr Gln Lys Val Ala Pro Thr Val Val
      100      105      110

Val Asp Tyr Asn Lys His Lys Tyr Leu Glu Gln Gln Glu Met Leu Gly
      115      120      125

Lys Ile Val Gly Lys Glu Asp Lys Val Lys Ala Trp Lys Lys Asp Trp
      130      135      140

Glu Glu Thr Thr Ala Lys Asp Gly Lys Glu Ile Lys Lys Ala Ile Gly
145      150      155      160

Gln Asp Ala Thr Val Ser Leu Phe Asp Glu Phe Asp Lys Lys Leu Tyr
      165      170      175

Thr Tyr Gly Asp Asn Trp Gly Arg Gly Gly Glu Val Leu Tyr Gln Ala
      180      185      190

Phe Gly Leu Lys Met Gln Pro Glu Gln Gln Lys Leu Thr Ala Lys Ala
      195      200      205

Gly Trp Ala Glu Val Lys Gln Glu Glu Ile Glu Lys Tyr Ala Gly Asp
210      215      220

Tyr Ile Val Ser Thr Ser Glu Gly Lys Pro Thr Pro Gly Tyr Glu Ser
225      230      235      240

Thr Asn Met Trp Lys Asn Leu Lys Ala Thr Lys Glu Gly His Ile Val
      245      250      255

Lys Val Asp Ala Gly Thr Tyr Trp Tyr Asn Asp Pro Tyr Thr Leu Asp
      260      265      270

Phe Met Arg Lys Asp Leu Lys Glu Lys Leu Ile Lys Ala Ala Lys
      275      280      285

```

<210> 7

<211> 288

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Variante de la proteína Staphylococcus aureus

<220>

<221> Xaa

<222> 4

<223> Cualquier aminoácido que no contenga un grupo tiol libre.

5 <400> 7

```

Met Ala Ser Xaa Gly Asn Gln Gly Glu Lys Asn Asn Lys Ala Glu Thr
1          5          10          15

Lys Ser Tyr Lys Met Asp Asp Gly Lys Thr Val Asp Ile Pro Lys Asp
20          25          30

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

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

Lys Val Leu Lys Asp Lys Phe Lys Gly Val Thr Lys Ile Gly Asp Gly
65          70          75          80

Asp Val Glu Lys Val Ala Lys Glu Lys Pro Asp Leu Ile Ile Val Tyr
85          90          95

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

Val Val Asp Tyr Asn Lys His Lys Tyr Leu Glu Gln Gln Glu Met Leu
115         120         125

Gly Lys Ile Val Gly Lys Glu Asp Lys Val Lys Ala Trp Lys Lys Asp
130         135         140

Trp Glu Glu Thr Thr Ala Lys Asp Gly Lys Glu Ile Lys Lys Ala Ile
145         150         155         160

```

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

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99,5% de identidad con la SEQ ID NO: 4, en el que el residuo de cisteína que corresponde a la posición 4 de la SEQ ID NO: 3 se suprime, el polipéptido no contiene ningún residuo de aminoácido cisteína y puede provocar anticuerpos que reconocen la SEQ ID NO: 2.
2. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6.
3. Una proteína híbrida que comprende el polipéptido de la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
4. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 o la proteína híbrida de la reivindicación 3.
5. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 4.
6. Una célula huésped que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 4 o el vector de la reivindicación 5.
7. Un procedimiento de preparación del polipéptido de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 o la proteína híbrida de la reivindicación 3, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 6 bajo condiciones en las que dicha proteína se expresa y recuperar dicha proteína así producida.
8. Una composición inmunogénica que comprende el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 o la proteína híbrida de la reivindicación 3.
9. La composición inmunogénica de la reivindicación 8, que comprende además uno o más conjugados de (i) un exopolisacárido o polisacárido capsular de *S. aureus* y (ii) una proteína portadora.
10. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 8 o la reivindicación 9, que comprende además un adyuvante (por ejemplo, un adyuvante de hidróxido de aluminio) y/o un sacárido (por ejemplo, sacarosa).
11. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, que comprende además un aditivo estabilizante.
12. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en forma liofilizada.
13. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en forma acuosa.
14. Un procedimiento de preparación de la composición de la reivindicación 13, mediante la reconstitución de la composición de la reivindicación 12 con material acuoso.
15. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, la proteína híbrida de la reivindicación 3 o la composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14.
16. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13 o 15 para uso en un procedimiento para provocar una respuesta inmune en un mamífero para protegerlo contra infección por *S. aureus*.

FIGURA 1

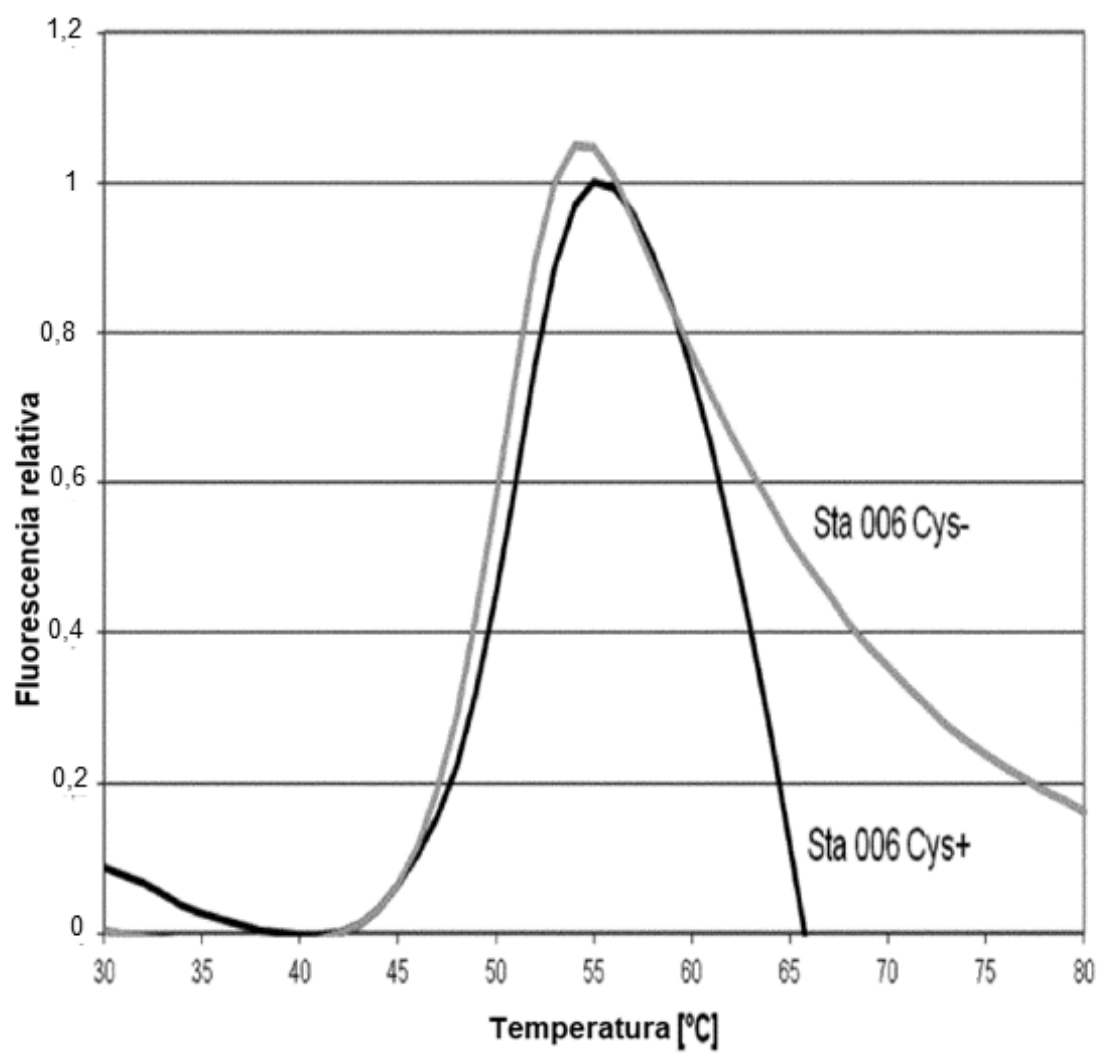


FIGURA 2

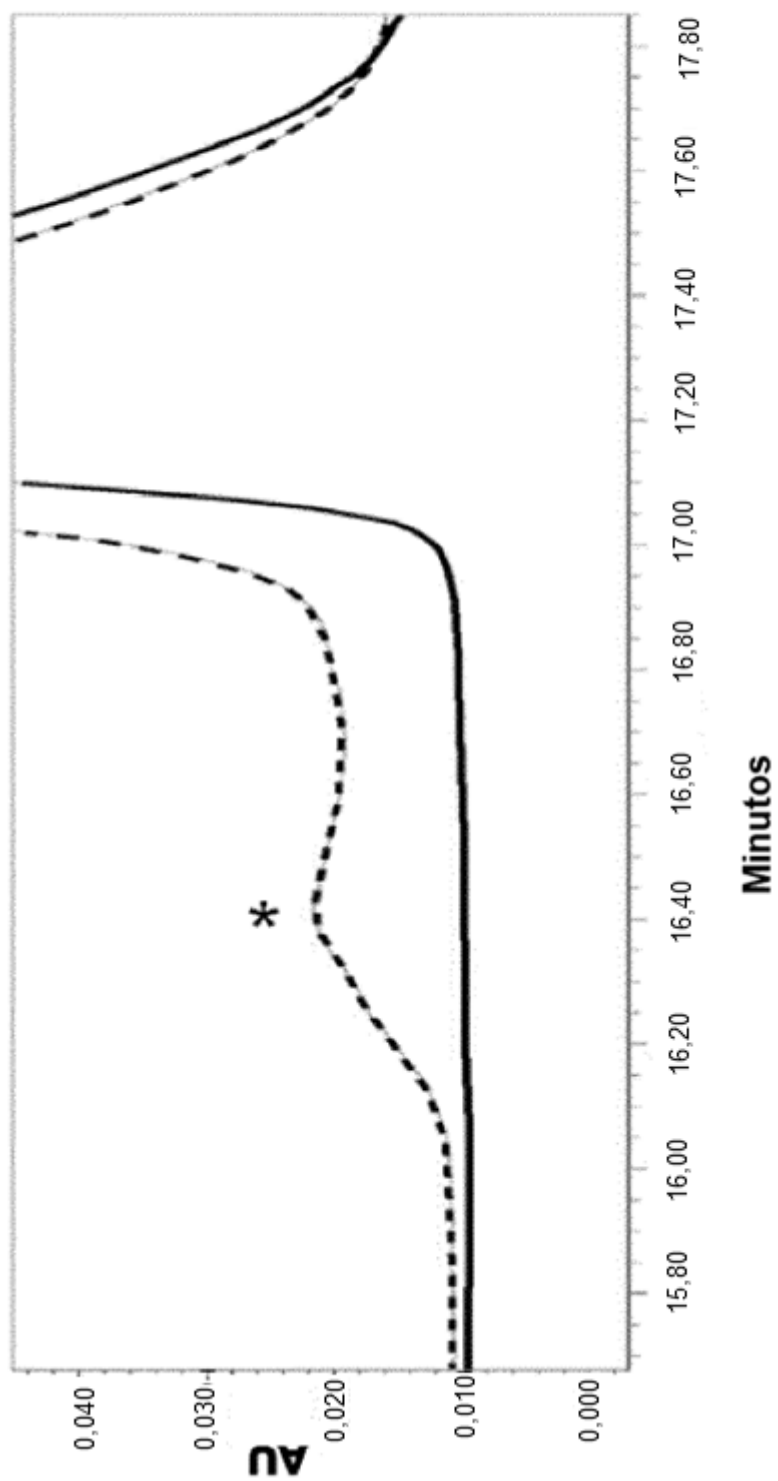


FIGURA 3

