



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2019-0133290  
(43) 공개일자 2019년12월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 39/395* (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)  
*A61K 38/16* (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)  
*A61K 38/19* (2006.01) *A61K 38/20* (2006.01)  
*A61K 39/00* (2006.01)  
 (52) CPC특허분류  
*A61K 39/395* (2013.01)  
*A61K 38/00* (2013.01)  
 (21) 출원번호 10-2019-7034641(분할)  
 (22) 출원일자(국제) 2011년05월05일  
 심사청구일자 없음  
 (62) 원출원 특허 10-2018-7036903  
 원출원일자(국제) 2011년05월05일  
 심사청구일자 2019년01월14일  
 (85) 번역문제출일자 2019년11월22일  
 (86) 국제출원번호 PCT/US2011/035354  
 (87) 국제공개번호 WO 2011/140337  
 국제공개일자 2011년11월10일  
 (30) 우선권주장  
 61/331,550 2010년05월05일 미국(US)

(71) 출원인  
 뉴욕 유니버시티  
 미국 뉴욕주 10012 뉴욕 워싱턴 스퀘어 사우스70  
 (72) 발명자  
 토레스 빅터 제이.  
 미국 뉴욕주 10016 뉴욕 퍼스트 애비뉴 564 아파  
 트먼트 23이  
 듀몬트 애슐리 엘.  
 미국 뉴욕주 10016 뉴욕 퍼스트 애비뉴 564 아파  
 트먼트 18지  
 (74) 대리인  
 특허법인 광장리앤고

전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 스타필로코커스 아우레우스 류코시딘, 치료 조성물 및 그것의 용도

**(57) 요약**

본 명세서에서 LukAB로 언급되는 분리 및 정제된 스타필로코커스 아우레우스 2성분 류코시딘, 및 그것의 성분 LukA 및 LukB, LukA에 특이적인 항체, LukB에 특이적인 항체, LukA 및/또는 LukB를 함유하는 치료 조성물, 또는 항LukA 및/또는 항LukB 항체, 급성 염증 질환 또는 스타필로코커스 아우레우스 감염을 치료하기 위한 조성물의 용도, 인간 식세포의 LukAB-매개 세포독성 억제제의 확인 방법, 및 스타필로코커스 아우레우스 감염의 중증도를 예측하기 위한 마커로서 LukAB의 사용방법이 개시된다.

(52) CPC특허분류

*A61K 38/16* (2013.01)

*A61K 38/17* (2013.01)

*A61K 38/19* (2013.01)

*A61K 38/20* (2013.01)

*A61K 39/00* (2013.01)

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

본 명세서에 기재된 모든 발명.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] **관련출원과의 상호참조**

[0002] 본 출원은 2010년 5월 5일 출원된 미국 가특허출원 제61/331,550호의 출원일의 우선권을 주장하며, 이 기초출원은 본 명세서에 참조로 포함되어 있다.

[0003] **서열 목록**

[0004] 본 출원은 EFS-Web을 통해 제출된 서열목록을 포함하며, 본 명세서에 그것 전체가 참조로 포함된다. 2011년 5월 2일 만든 상기의 ASCII 복제물은 Sequence Listing\_Staphylococcus Aureus Leukocidins\_ST25.txt로 명명하며, 용량은 102 킬로바이트이다.

**배경 기술**

[0005] 스태피로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 박테리아 또는 "스타프(staph)"는 보통 사람 및 동물의 피부 상에서 또는 코 안에서 발견된다. 스태프 박테리아는 그것이 자상 또는 다른 상처를 통해 신체 내로 들어오지 않는다면, 일반적으로 무해하다. 전형적으로 스태프 감염은 건강한 사람에게 중요하지 않은 피부 문제이다. 역사적으로 스태프 감염은 메티실린과 같은 광범위 항생제로 치료되었다. 그러나 현재 특정 스태프 균주는 메티실린 및 다른 β-락탐 항생제, 예컨대 페니실린 및 세팔로스포린에 내성이 있는 것으로 나타났다. 그들은 메티실린-내성 스태피로코커스 아우레우스(다제내성(multi-drug resistant) 스태피로코커스 아우레우스, 또는 "MRSA"로도 알려짐)라 지칭된다.

[0006] MRSA를 포함하는 스태프 감염은 일반적으로 여드름, 종기 또는 거미물림과 유사한 작고 붉은 혹은으로 시작한다. 이 혹은 또는 흡은 수술에 의한 물 제거가 필요한 깊고, 아픈 농양으로 빠르게 바뀔 수 있다. 때때로 박테리아는 피부에 국한된 채로 남아있다. 가끔 그것들은 신체 내로 깊이 파고들 수 있어서, 피부, 연조직, 뼈, 관절, 수술 창상, 혈류, 판막, 폐, 또는 다른 기관을 포함하는 인간 조직의 넓은 범위에서 잠재적으로 생명을 위협하는 감염을 야기한다. 따라서, 스태피로코커스 아우레우스 감염은 근막염, 폐렴, 심내막염, 패혈증, 독성 쇼크 증후군, 및 다양한 형태의 폐렴과 같은 잠재적으로 치명적인 질병을 초래할 수 있다. MRSA 감염은 환자가 개방창, 삼입 의료기기 및 약화된 면역계를 갖는 경향이 있는 병원 또는 사설 요양소에서 특히 문제가 되며, 따라서 공중에서보다 감염 위험이 더 크다. 적절한 위생 절차를 따르지 않는 노동자들은 한 명의 환자로부터 다른 환자에게 MRSA 박테리아를 전달할 수 있다.

[0007] 스태피로코커스 아우레우스는 이 박테리아가 상이한 종류의 면역 세포, 구체적으로 신체의 주요 방어 시스템을 구성하는 백혈구의 아집단에 의한 공격을 중화하거나 이겨낼 수 있도록 하는 독성인자 및 독소의 다양한 집합체를 생산한다. 이 독성인자 및 독소의 생산은 스태피로코커스 아우레우스가 감염 상태를 유지하도록 한다. 문헌[Nizet, J. Allergy Clin. Immunol. 120:13-22(2007)] 참조. 이 독성 인자 중에서, 스태피로코커스 아우레우스는 몇몇 2성분 류코톡신을 생산하는데, 이는 2가지 비결합 단백질 또는 서브유닛의 상승적 작용에 의해 숙주 방어 세포 및 적혈구의 구성원을 손상한다. 문헌[Supersac, et al., Infect. Immun. 61:580-7(1993)] 참조. 이런 2성분 류코톡신 중에서, 감마-용혈소(HlgAB 및 HlgCB) 및 판톤-발렌틴 류코시딘(Pantone-Valentine Leukocidin: PVL)이 가장 특징 규명되어 있다.

[0008] 포유류 세포에 대한 류코시딘의 독성은 2성분 작용을 수반한다. 제1 서브유닛은 클래스 S-서브유닛(즉, "지연-용리")으로 칭해지며, 제2 서브유닛은 클래스 F-서브유닛(즉, "속성-용리")으로 칭해진다. S- 및 F-서브유닛은 상승적으로 작용하여 단핵구, 대식세포, 수지상 세포(총괄적으로 식세포(phagocyte)로 알려짐)를 포함하는 백혈구 세포 상에 구멍을 형성한다. 문헌[Menestrina, et al., Toxicol. 39:1661-1672(2001)]을 참조. 2성분 독소에 의해 표적 세포막 내 구멍을 형성하는 메커니즘은 완전히 이해되지 않는다. 이들 독소의 제한된 작용 메커니

증은 아마도 수용체를 통해 표적 세포막으로의 S-서브유닛의 결합 후 S-서브유닛으로의 F-서브유닛의 결합을 수반하고, 이에 의해 올리고머를 형성하고 표적 세포막 내로 삽입되는 프레-포어(pre-pore)를 차례로 형성한다 (Jayasinghe, et al., Protein. Sci. 14:2550-2561(2005)). 2성분 류코톡신에 의해 형성된 구멍은 전형적으로 양이온 선택적이다. 구멍 형성은 용해를 통한 세포사를 야기하는데, 이는 표적 백혈구의 경우에 양이온 유입에 기인하는 삼투압 불균형으로부터 초래되는 것으로 보고되었다(Miles, et al., Biochemistry 40:8514-8522(2001)).

[0009] PVL(류코시딘 S/F-PV 또는 LukSF-PV로 알려짐) 및 감마-용혈소(HlgAB 및 HlgCB)에 더하여, 스타필로코커스 아우레우스에 의해 생산된 2성분 류코톡신의 레퍼토리는 류코시딘 E/D(LukED) 및 류코시딘 M/F'(LukMF')를 포함하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 이들 2성분 류코시딘의 S-클래스 서브유닛은 HlgA, HlgC, LukE, LukS-PV 및 LukM을 포함하며, F-클래스 서브유닛은 HlgB, LukD, LukF-PV 및 LukF'-PV(Menestrina, et al., 상기와 같음)을 포함한다. 스타필로코커스 아우레우스 S- 및 F-서브유닛은 류코시딘 특이적이지 않다. 즉, 그것들은 다른 2성분 조합이 백혈구 내 기능적 구멍을 만들 수 있도록 상호호환가능하며, 이는 류코톡신의 레퍼토리를 크게 증가시킨다(Meyer, et al., Infect. Immun. 77:266-273(2009)).

[0010] MRSA 감염을 치료하기 위한 효과적인 치료를 설계하는 것은 특히 곤란하였다. 메티실린 및 관련 항생제에 대해 앞서 언급한 내성에 추가로, MRSA는 또한 매크로라이드(예를 들어, 에리트로마이신), 베타-락타마제 억제제 조합(예를 들어, 유나신, 오구멘틴) 및 플루오로퀴놀론(예를 들어, 시프로플록사신)에 대해서 뿐만 아니라 클린다마이신, 트라이메토프림/설파메톡시솔(박트림), 리팜핀에 대해 상당한 수준의 내성을 가지고 있다는 것을 발견하였다. 중증의 스타필로코커스 아우레우스 감염의 경우에, 임상되는 정맥주사 반코마이신에 의지하였다. 그러나, 반코마이신에 내성이 있는 스타필로코커스 아우레우스가 보고되었다. 따라서, 스타필로코커스 아우레우스 감염에 효과적으로 싸우는 신규 항생제 약물을 개발할 필요가 있다.

**발명의 내용**

[0011] 본 출원인은 천연 스타필로코커스 아우레우스 방어 시스템의 별개의 2성분 구성원을 발견하였고 특징 규명하였다. 새로 특징 규명된 천연 S-서브유닛 폴리펩타이드 성분은 본 명세서에서 "LukA"로 언급되는데, 이는 천연 폴리펩타이드 및 천연 폴리펩타이드의 서열과 적어도 70%의 서열 유사성을 가지는 그것의 유사체를 포괄한다. 따라서, 본 발명의 양태는 분리된 및/또는 정제된 LukA에 관한 것이다. 본 발명의 다른 양태는 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 형질전환된 숙주(예를 들어, 세포)인 분리된 및/또는 정제된 폴리뉴클레오타이드 암호화 LukA, 및 형질전환된 숙주 내 폴리뉴클레오타이드의 발현을 통한 재조합 LukA의 제조방법에 관한 것이다.

[0012] 새로 특징 규명된 F-서브유닛 폴리펩타이드 성분은 본 명세서에서 "LukB"로 언급되는데, 이는 천연 폴리펩타이드 및 천연 폴리펩타이드의 서열과 적어도 70%의 서열 유사성을 가지는 그것의 유사체를 포괄한다. 따라서, 본 발명의 다른 양태는 분리된 및/또는 정제된 LukB에 관한 것이다. 본 발명의 다른 양태는 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 형질전환된 숙주(예를 들어, 세포)인 분리된 및/또는 정제된 LukB 암호화 폴리뉴클레오타이드, 및 형질전환된 숙주 내 폴리뉴클레오타이드의 발현을 통한 재조합 LukB의 제조방법에 관한 것이다.

[0013] 본 출원의 또 다른 양태는 약제학적으로 허용가능한 담체 내 조제된 LukA 및/또는 LukB의 치료적 유효량을 함유하는 스타필로코커스 아우레우스 감염의 개시를 억제하거나 치료하는데 유용한 치료 조성물에 관한 것이다. 따라서, 한 실시형태에서, 치료 조성물은 치료적 유효량의 LukA를 함유한다. 다른 실시형태에서, 치료 조성물은 치료적 유효량의 LukB를 함유한다. 또 다른 실시형태에서, 치료 조성물은 LukA와 LukB 둘 다의 치료적 유효량을 함유한다. 또 다른 실시형태에서, 해당 조성물은 10C-말단 잔기가 없고 비독성인 LukA의 유사체를 함유한다(본 명세서에서 LukAΔ10C 또는 rLukAΔ10C로 언급됨). 이 조성물은 다수의 치료적 용도를 가진다. 일부 실시형태에서, 해당 조성물은 항염증 조성물로 언급되며, 급성 염증 질환 또는 장애, 특히 국소화된 급성 염증 질환을 치료하기 위하여 사용될 수 있다.

[0014] 이 용도는 출원인의 추가적인 발견을 생리적 조건(즉, 스타필로코커스 아우레우스에 의해 직접적으로 생산된 LukAB)하에서, 해당 LukAB 복합체는 식세포에 대해 예민한 특이성을 갖지만, 상피세포 및 내피세포와 같은 다른 유핵세포에는 그렇지 않다는 출원인의 추가 발견을 이용한다. 즉, 복합체는 이런 종류의 세포 막 내 구멍을 형성하고, 따라서 본 명세서에서 "LukAB-매개 세포독성"으로 언급되는 세포사를 야기한다. 다른 한편으로, LukAB는 다른 유핵 포유류 세포에 대해서 상대적으로 작은 또는 무시해도 될 정도의 특이성을 가진다. 따라서, 본 발명의 항염증 조성물은 염증 부위에 식세포의 거대한 침윤을 특징으로 하는 급성 염증 질환을 치료하기 위한 목적으로 인간 식세포에 대한 LukAB의 특이성을 이용한다.

- [0015] 다른 실시형태에서, 치료 조성물은 (능동) 백신 조성물로 언급될 수 있다. 조성물은 스태필로코커스 아우레우스 감염의 위험에 있는 피험자 또는 MRSA와 같은 스태필로코커스 아우레우스 감염으로 진단된 피험자에서 항LukA 및 항LukB 중화항체의 생산을 유발하기 위하여 사용될 수 있다.
- [0016] 본 발명의 다른 양태는 LukA에 특이적으로 결합하는 항체, LukB에 특이적으로 결합하는 항체, LukA 및/또는 LukB 항체를 함유하는 치료 조성물 및 스태필로코커스 아우레우스 감염 질환을 치료하기 위한 그것의 용도에 관한 것이다. 이 치료 조성물은 수동백신(passive vaccine) 조성물로 언급될 수 있다. 따라서, 한 실시형태에서, 치료 조성물은 항LukA 항체의 치료적 유효량을 함유한다. 다른 실시형태에서, 치료 조성물은 항LukB 항체의 치료적 유효량을 함유한다. 또 다른 실시형태에서, 치료 조성물은 항LukA와 항LukB 항체 둘 다의 치료적 유효량을 함유한다.
- [0017] 본 발명의 수동백신 및 능동 백신은 MRSA와 같은 감염성의 독성 스태필로코커스 아우레우스 균주가 LukA 및 LukB를 발현시킨다는 출원인의 추가 발견을 이용한다. 스태필로코커스 아우레우스의 넓은 범위에 걸친 LukA 및 LukB의 보존은 본 발명의 백신이 전 범위의 치료적 유효성을 제공할 수 있게 한다. LukA, LukB, 항LukA 항체 및 항LukB 항체는 또한 본 명세서에서 활성제로 언급된다.
- [0018] 본 발명의 추가 양태는 LukAB-매개 세포독성의 잠재적 억제제를 확인하기 위하여 LukAB, LukA 및/또는 LukB를 사용하는 방법에 관한 것이다. 이 방법은 LukAB 복합체 그 자체를 식세포 또는 그것의 식세포 막 결합 부분과 조합하여 이용할 수 있다. 따라서 특정된 억제제는 스태필로코커스 아우레우스 감염의 치료를 목적으로 한 치료제의 후보가 될 수 있다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 추가 양태는 감염된 피험자로부터 수득한 생물학적 샘플 내 LukA 및/또는 LukB의 존재 또는 양을 검출하는 단계 또는 LukA 및/또는 LukB의 대응하는 유전자를 검출하는 단계를 수반하는 스태필로코커스 아우레우스 감염의 중증도를 예측 또는 평가하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 이 양태는 스태필로코커스 아우레우스에 의해 생산된 다수의 세포독성 중에서, LukAB가 인간 식세포에 대해 강한 독성을 나타낸다는 출원인의 또 다른 발견에 기반한다. 따라서, LukA 및/또는 LukB, 또는 거의 없는 또는 검출가능하지 않은 양의 LukA 및/또는 LukB를 생산하는 대조군(예를 들어, 스태필로코커스 아우레우스 균주 USA100 및 USA400)에 비해 그것의 대응하는 유전자(예를 들어 스태필로코커스 아우레우스 균주 Newman, 4645, 및 MRSA 균주 USA300 및 USA500으로 나타냄)의 존재 또는 비교적 다량의 검출은 중증의 스태필로코커스 아우레우스 감염을 나타낸다.
- [0020] 본 발명의 이런 양태 및 다른 양태는 이하에서 더욱 완전하게 기재된다.

### 도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1(즉, 도 1a 내지 도 1e)은 주된 LukA 서열(서열번호 1로 지정), 및 그것에 대응하는 13가지의 상이한 스태필로코커스 아우레우스 균주로부터의 LukA 폴리펩타이드(서열번호 2 내지 14로 지정)의 아미노산 서열을 함유하는 배열이다.
- 도 2(즉, 도 2a 내지 도 2e)는 주된 LukB 서열(서열번호 15로 지정), 및 그것에 대응하는 12가지의 상이한 스태필로코커스 아우레우스 균주로부터의 LukB 폴리펩타이드(서열번호 16 내지 27로 지정)의 아미노산 서열을 함유하는 배열이다.
- 도 3. LukAB는 최초 인간식세포를 표적화하고 사멸시키는 강한 스태필로코커스 세포독소이다. (A) 스태필로코커스 아우레우스 균주 Newman(WT) 및 표시한 동질유전자 돌연변이체 균주로부터의 배양물 여과액(2.5% v/v)에 의한 최초 인간말초혈액단핵구(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)의 중독. 세포 생존력을 CellTiter를 사용하여 모니터링하였으며, 배지로 처리한 세포를 100%로 설정하였다. 결과는 3회의 샘플 평균 + 표준편차(S.D)를 나타낸다. (B) 스태필로코커스 아우레우스 균주 Newman(WT) 및 표시한 동질유전자 돌연변이체 균주로부터의 배양물 여과액(2.5% v/v)에 의한 최초 인간단핵구, 대식세포, 및 수지상 세포(DC)의 독성. 세포 생존력을 상기 기재한 바와 같이 모니터링하였다. 결과는 각 공여자로부터의 세포가 3개의 독립적 외부단백질 제조로 중독된 2인의 공여자로부터의 평균 + S.E.M을 나타낸다. (C) 스태필로코커스 아우레우스 균주 Newman(WT) 및 표시한 동질유전자 돌연변이체 균주로부터 배양물 여과액의 다양한 희석에 의한 최초 인간 PMN의 중독. 세포 생존력을 상기 기재한 바와 같이 모니터링하였다. 결과는 4인의 공여자로부터 분리된 PMN으로부터의 평균 ± S.E.M.을 나타낸다. (D) 표시한 농도의 정제된 rLukA, rLukB, 또는 rLukA와 rLukB의 조합에 의한 최초 인간 PMN의 중독. \*는 rLukA와 rLukB 둘 다로부터의 통계학적 유의도를 나타낸다,  $P < 0.05$ . 패널 (a-c)에 대해, \*는 WT로부터 통계학적 유의도를 나타내며, \*\*는  $\Delta$ LukAB/p로부터의 통계학적 유의도를 나타낸다,  $P < 0.05$ (스튜던트 t 테스트

p<0.05).

도 4. LukAB는 인간 식세포를 우선적으로 표적화한다. 스타필로코커스 아우레우스 WT 균주 Newman, 표시한 유전자/독소가 없는 동질유전자 돌연변이체 균주로부터 배양물 여과액, (C) 빈 플라스미드를 함유하는 스타필로코커스 아우레우스 WT(WT/p), 빈 플라스미드를 함유하는 LukAB가 없는 균주( $\Delta$ LukAB/p), 및 LukAB 상보성 플라스미드를 함유하는 LukAB가 없는 균주( $\Delta$ LukAB/pLukAB)로부터의 배양물, 또는 (D) 표시한 농도의 정제된 제조합 LukA(rLukA), LukB(rLukB), 또는 rLukA와 rLukB(rLukA+rLukB)의 조합을 사용한 (A, C 및 D) PMN-HL60 세포 또는 (B) THP1 세포의 중독. rLukA와 rLukB 둘 다에 의한 중독에 대해, 총 단백질 농도는 동일한 양의 rLukA 및 rLukB를 포함한다(예를 들어 2.8 $\mu$ g의 총 단백질은 1.4 $\mu$ g의 rLukA 및 1.4 $\mu$ g의 rLukB와 동일하다). (E) 10 $\mu$ g/ml의 rLukAB를 사용한 표시한 인간 세포주의 중독. 배지로 처리한 세포가 100%로 설정된 CellTiter를 사용하여 세포 생존력을 모니터링하였다. 결과는 3회 샘플의 평균  $\pm$  S.D.를 나타낸다. 별표(\*)는 WT와 비교하여 통계적 유의차를 나타낸다(일 방향 ANOVA).

도 5. LukAB는 상이한 스타필로코커스 균주 내 중요한 독소이다. (A) 항LukB 다클론성 혈청을 사용하여 웨스턴 블롯 분석으로 결정한 다양한 스타필로코커스 아우레우스 균주에 의한 LukB의 발현. (B) 상이한 스타필로코커스 아우레우스 균주로부터 외부단백질의 회석에 의한 PMN-HL60의 중독. 배지로 처리한 세포가 100% 살아있는 것으로 설정한 CellTiter를 사용하여 세포 생존력을 모니터링하였다. (C) 독소 특이적 혈청을 사용하는 웨스턴블롯 분석으로 결정한 WT 및 LukAB 동질유전자 균주에 의한 LukB 및  $\alpha$ -독소의 발현. (D) WT 균주 Newman(New.) 및 4645, 및 LukAB 동질유전자 균주로부터의 외부단백질에 의한 PMN-HL60의 중독. 패널 B에서와 같이 세포 생존력을 모니터링하였다. 결과는 3회 샘플의 평균 + S.D.를 나타낸다. \*는 Newman(C) 또는 WT(E)와 비교하여 통계적으로 유의한 차이를 나타낸다(스튜던트 t 테스트 p<0.05).

도 6. LukAB는 표적 세포의 혈장 막을 파괴한다. (A) 스타필로코커스 아우레우스 WT 균주 및 LukAB가 없는 동질유전자 균주로부터의 배양물 여과액으로 중독된 PMN-HL60 세포의 광 현미경 이미지( $\Delta$ LukAB). (B-C) WT 균주(WT/p), LukAB가 없는 동질유전자 균주( $\Delta$ LukAB/p), 상보적 균주( $\Delta$ LukAB/pLukAB), 또는 배지로 중독된 mock)으로부터 배양물 여과액에 의한 PMN-HL60의 중독. 손상된 막이 있는 세포를 SYTOX Green으로 염색하고, 형광 현미경으로 이미지화하였으며(C), 녹색 형광 강도를 측정하였다(B). (D) PMN에 스타필로코커스 아우레우스 균주 Newman(MSSA) 또는 USA300 균주 LAC(MRSA) 및 표시한 동질유전자 돌연변이체로 다양한 감염 다중도(multiplicities of infection, MOI)로 생체 밖 감염시켰다. SYTOX Green으로 막 손상을 모니터링하였다. 결과는 3회 샘플의 평균  $\pm$  S.D.를 나타낸다. 별표(\*)는 WT와 비교하여 통계적으로 유의한 차이를 나타낸다(스튜던트 t 테스트 p<0.05).

도 7. LukAB는 식세포를 표적화하고 사멸시킴으로써 숙주 매개 사멸로부터 스타필로코커스 아우레우스를 보호한다. (A) 스타필로코커스 아우레우스 WT, lukAB가 없는 균주, 및 lukAB 상보적 플라스미드를 함유하는 lukAB가 없는 균주( $\Delta$ LukAB/plukAB)에 의한 다양한 감염 다중도(MOI)를 사용한 PMN-HL60 세포의 감염. 손상된 막이 있는 포유류 세포를 도 6에 기재한 바와 같이 SYTOX Green으로 모니터링하였다. 결과는 3회 샘플의 평균 + S.D.를 나타낸다. (B) 인간 전혈의 생체 밖 감염 시 표시한 스타필로코커스 아우레우스 균주의 생존력. 결과는 12인의 공여자로부터 분리된 전혈로부터의 평균 + S.E.M.을 나타낸다. (C) 최초 인간호중구(PMN)의 감염 시 표시한 스타필로코커스 아우레우스 Newman 균주의 생존력. 결과는 12인의 공여자로부터 분리된 PMN으로부터의 평균 + S.E.M.을 나타낸다. (D) WT/p,  $\Delta$ lukAB/p, 및  $\Delta$ lukAB/plukAB 균주로부터 배양물 여과액의 다양한 회석에 의한 최초 인간 PMN의 중독. LDH-방출을 세포 용해의 지표로 측정하였다. 결과는 6인의 공여자로부터 분리된 PMN의 평균 + S.E.M.을 나타낸다. 별표(\*)는 WT 균주 Newman과 비교하여 통계적 유의차를 나타낸다(스튜던트 t 테스트 p<0.05).

도 8. LukAB는 생체 내 스타필로코커스 아우레우스의 발병에 중요하다. (A) pXen1 또는 pLukAB.Xen1을 함유하는 스타필로코커스 아우레우스 균주 LAC로 감염된 마우스로부터 신장의 생물발광 이미지. 그룹 당 2개의 대표적인 마우스의 신장을 나타낸다. (B) 표시한 스타필로코커스 아우레우스 LAC 균주로 역 레도로(retro-orbitally) 감염된 마우스의 신장으로부터 회수한 박테리아 부하. 각 데이터 점은 한 마리의 동물 내 조직 호모게네이트의 밀리리터 당 박테리아 수(CFU)를 나타낸다. 파선은 검출한계를 나타낸다. 패널(A 내지 C 및 E)에 대해, \*는 WT로부터 통계적 유의도를 나타내고, \*\*는  $\Delta$ LukAB/p로부터의 통계적 유의도를 나타낸다, P < 0.05.

도 9. LukAB는 세포 막 상에서 구멍을 형성함으로써 인간 식세포를 사멸한다. (A) PMN-HL60 세포를 rLukA+rLukB로 중독시켰고, LukA 또는 LukB에 특이적인 항체를 사용하여 SDS-PAGE 및 면역블롯팅으로 독소 결합을 모니터링하였다. (B) PMN-HL60을 rLukAB와 함께 인큐베이션하였고 독소 결합을 토끼 항His 항체를 사용하여 FACS로 결정

하였다, (C) PMN-HL60 세포를 rLukAB로 중독시키고 혈장 막 내 LukAB 올리고머의 형성을 SDS-PAGE 및 항LukB 항체를 사용하는 면역블롯팅으로 판정하였다, (D) PEG-400의 존재 또는 부재하에 rLukAB으로 중독된 또는 사포닌으로 처리된 PMN-HL60. LukAB 구멍을 브롬화에티듐으로 검출하였다. (E) 배지로 처리한 세포를 100% 설정한 CellTiter로 판정한 패널에서와 같이 처리된 PMN-HL60의 생존력. 패널 d 및 e의 결과는 3회 샘플의 평균 +/- SEM의 평균을 나타낸다. \*는 PEG(패널 D 내지 E)에 대한 통계적 유의차를 나타낸다(스튜던트 t 테스트 p<0.05).

도 10. LukAB 세포독성은 α-LukA 다클론성 항체로 중화될 수 있다. 2마리의 상이한 토끼로부터의 다양한 생산 채널 유래의 α-LukA 다클론성 항체 또는 면역전 혈청의 표시량으로 인큐베이션한 스타필로코커스 아우레우스 균주 Newman으로부터의 5%(v/v) 배양물 여과액을 사용한 PMN-HL60의 중독. 배지로 처리한 세포를 100% 설정한 CellTiter를 사용하여 세포 생존력을 모니터링하였다. 결과는 3회 샘플의 평균 ± 표준편차(S.D.)를 나타낸다.

도 11(즉, 도 11a 내지 도 11c). LukA C-말단 확장은 LukAB의 세포독성 효과에 필요하지만 α-LukA 다클론성 항체에 의한 인식에 필요하지 않다. 도 11a: 다양한 스타필로코커스 아우레우스 류코톡신 S-서브유닛으로부터의 아미노산 서열의 배열(서열번호 44 내지 49로 지정)은 Lasergene 소프트웨어로부터의 MegAlign Clustal W 방법을 사용하여 수행된다. LukA 서열 내에만 존재하는 N- 및 C-말단 확장은 박스로 강조 표시한다. 도 11b: 대장균으로부터 정제된, SDS-PAGE에 의해 분리된, rLukB와 짝지어진, 다양한 양의 rLukA, rLukAΔ10C 및 rΔ33NLukA에 의한 PMN-HL60의 중독에 의해 수반되는 2μg의 재조합 LukA(rLukA), LukB(rLukB), C-말단의 확장이 없는 LukA(rLukAΔ10C) 및 N-말단의 연장이 없는 LukA(rΔ33NLukA)의 쿠마쎬 블루 염색. 최종 단백질 농도는 동일한 양의 rLukA, rLukAΔ10C 또는 rΔ33NLukA 및 rLukB를 나타낸다. 결과는 3회 샘플의 평균 ± S.D를 나타낸다. 도 11c: α-LukA와 α-His 다클론성 항체 둘 다에 의한 6 x His-태그 rLukAΔ10C의 동등한 인식을 나타내는 면역블롯.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0022] 다음의 개시는 연속적 순서로 LukA 폴리펩타이드, LukB 폴리펩타이드, LukA 및 LukB 폴리뉴클레오타이드, 항 LukA 및 항LukB 항체, LukA 및/또는 LukB를 함유하는 치료 조성물, 또는 항LukA 및/또는 항LukB 항체, 치료 조성물의 사용 방법, LukAB-매개 세포독성의 억제제의 확인 방법, 및 스타필로코커스 아우레우스 감염의 중증도 예측 또는 평가 방법에 관한 것이다.

[0023] **LukA 폴리펩타이드**

[0024] 스타필로코커스 아우레우스에 천연인 폴리펩타이드는 현재 분리되었으며 공지된 S-서브유닛 류코시딘(예를 들어, LukS-PVL, LukE 및 HlgC)의 활성 프로파일을 나타내는 것이 출원인에 의해 확인되었다. LukA로서 본 명세서에서 총괄적으로 지정되는 이 폴리펩타이드는 인간 식세포를 특이적으로 표적화하고 결합하며(그러나 인간 상피 또는 인간 내피세포, 또는 뮤린 세포는 아님), 일단 식세포 막에 결합하면, LukA는 스타필로코커스 아우레우스 F-서브유닛 류코시딘으로 올리고머화하고(예를 들어, 본 명세서에 개시된 LukF-PVL, LukD 및 HlgB, 및 LukB), 올리고머화시 막관통 구멍을 형성한다(총괄적으로 LukA 활성으로 언급됨). 도 1에서 예시한 배열은 주된 LukA의 아미노산 서열(본 명세서에서 서열번호 1로 지정), 및 그것이 대응하는 스타필로코커스 아우레우스의 13 가지 상이한 균주로부터의 LukA 폴리펩타이드의 아미노산 서열(본 명세서에서 서열번호 2 내지 14로 지정)을 함유한다.

[0025] 각각의 서열번호 1 내지 14에서 N-말단의 27개 아미노산 잔기는 천연 분비/신호 서열을 나타낸다. 따라서, 각각의 서열번호 1 내지 14에서 아미노산 잔기 28 내지 351로 표시한 LukA의 성숙한 분비 형태는 본 명세서에서 "LukA(28-351)" 또는 "성숙 LukA"로 언급될 수 있다. 대응적으로, 미숙한 형태의 LukA는 본 명세서에서 "LukA(1-351)"로 언급될 수 있다.

[0026] 서열번호 2-14에 기반한 LukA 공통서열(천연 스타필로코커스 아우레우스 LukA에 대해 포괄적이지 않음)은 따라서 LukA의 최소 64 위치에서 가변성을 포함하며(가변성의 연속적 위치는 X<sup>1</sup>-X<sup>64</sup>로 나타냄), 다음과 같이 지정한다: 8(X<sup>1</sup>=L 또는 F), 16(X<sup>2</sup>=A 또는 V), 17(X<sup>3</sup>=I 또는 L), 24(X<sup>4</sup>=T 또는 N), 26(X<sup>5</sup>=Q 또는 E), 31(X<sup>6</sup>=H 또는 N), 38(X<sup>7</sup>=N 또는 T), 46(X<sup>8</sup>=S 또는 A), 50(X<sup>9</sup>=E 또는 D), 55(X<sup>10</sup>=T 또는 N), 56(X<sup>11</sup>=N 또는 D), 61(X<sup>12</sup>=S 또는 T), 62(X<sup>13</sup>=T 또는 P), 63(X<sup>14</sup>=A, G 또는 V), 73(X<sup>15</sup>=I 또는 V), 78(X<sup>16</sup>=E 또는 V), 77(X<sup>17</sup>=T 또는 S), 80(X<sup>18</sup>=V 또는 E), 83(X<sup>19</sup>=E 또는 K), 84(X<sup>20</sup>=E 또는 K), 105(X<sup>21</sup>=V 또는 I), 124(X<sup>22</sup>=K 또는 R), 125(X<sup>23</sup>=E 또는 N), 127(X<sup>24</sup>=K, T 또는 N), 129(X<sup>25</sup>=S 또는 A), 130(X<sup>26</sup>=N 또는 S), 135(X<sup>27</sup>=K 또는 Q), 146(X<sup>28</sup>=R 또는 S), 148(X<sup>29</sup>=R 또는 P),

173(X<sup>30</sup>=S 또는 N), 174(X<sup>31</sup>=S 또는 L), 181(X<sup>32</sup>=T 또는 V), 184(X<sup>33</sup>=I 또는 V), 195(X<sup>34</sup>=T 또는 S), 202(X<sup>35</sup>=N 또는 K), 208(X<sup>36</sup>=S 또는 I), 214(X<sup>37</sup>=W 또는 R), 221(X<sup>38</sup>=I 또는 V), 229(X<sup>39</sup>=G 또는 N), 231(X<sup>40</sup>=V 또는 I), 237(X<sup>41</sup>=E 또는 D), 239(X<sup>42</sup>=L 또는 F), 243(X<sup>43</sup>=N 또는 T), 246(X<sup>44</sup>=I 또는 L), 247(X<sup>45</sup>=A 또는 S), 278(X<sup>46</sup>=L 또는 I), 283(X<sup>47</sup>=S 또는 T), 285(X<sup>48</sup>=E 또는 D), 288(X<sup>49</sup>=Q 또는 R), 299(X<sup>50</sup>=I 또는 V), 303(X<sup>51</sup>=R 또는 K), 309(X<sup>52</sup>=A 또는 G), 310(X<sup>53</sup>=P 또는 Q), 315(X<sup>54</sup>=K 또는 Q), 318(X<sup>55</sup>=D 또는 E), 322(X<sup>56</sup>=L 또는 F), 325(X<sup>57</sup>=T 또는 V), 338(X<sup>58</sup>=V 또는 I), 339(X<sup>59</sup>=D 또는 E), 342(X<sup>60</sup>=S 또는 T), 344(X<sup>61</sup>=D, E 또는 Q), 347(X<sup>62</sup>=P 또는 S), 348(X<sup>63</sup>=Y 또는 F) 및 349(X<sup>64</sup>=K 또는 R).

[0027] **LukB 폴리펩타이드**

[0028] 스타필로코커스 아우레우스에 천연인 폴리펩타이드는 현재 공지된 F-서브유닛 류코시딘(예를 들어, LukF-PVL, LukD 및 HlgB)의 활성 프로파일을 나타내는 것으로 본 출원인에 의해 확인되었다. 본 명세서에서 LukB로 총괄적으로 지정된 이들 폴리펩타이드는 인간 식세포에 결합된 스타필로코커스 아우레우스 S-서브유닛 류코시딘(예를 들어 본 명세서에 개시된 LukS-PVL, LukE 및 HlgC, 및 LukA)에 의해 특이적으로 올리고머화하고; 올리고머화 시 식세포 내 막관통 구멍을 형성한다(총괄적으로 LukB 활성으로 언급됨). 도 2에서 도시되는 배열은 주된 LukB 서열(본 명세서에서 서열번호 15로 지정) 및 그것이 대응하는 스타필로코커스 아우레우스의 12가지 상이한 균주로부터의 LukB 폴리펩타이드의 아미노산 서열(본 명세서에서 서열번호 16 내지 27로 지정)을 함유한다.

[0029] 각각의 서열번호 15 내지 27에서 N-말단의 29개 아미노산 잔기는 분비/신호 서열을 나타낸다. 따라서, 각각의 서열번호 16 내지 27에서 아미노산 잔기 30 내지 339로 나타내는 LukB의 성숙 분비 형태는 본 명세서에서 "LukB(30-339)" 또는 "성숙 LukB"로 언급될 수 있다. 대응적으로, LukB의 미숙한 형태는 본 명세서에서 "LukA(1-339)"로 언급될 수 있다.

[0030] 따라서 서열번호 15 내지 28에 기반한 LukB 공통서열(천연 스타필로코커스 아우레우스 LukB에 대해 포괄적이지 않음)은 LukB의 최소 49 위치에서 가변성을 포함하며(가변성의 연속적 위치는 X<sup>1</sup> 내지 X<sup>49</sup>로 나타낸다), 다음과 같이 지정된다: 5(X<sup>1</sup>=L 또는 V), 6(X<sup>2</sup>=C 또는 Y), 13(X<sup>3</sup>=S 또는 T), 15(X<sup>4</sup>=A 또는 T), 16(X<sup>5</sup>=L 또는 I), 19(X<sup>6</sup>=A 또는 T), 20(X<sup>7</sup>=L 또는 F), 23(X<sup>8</sup>=F 또는 L), 26(X<sup>9</sup>=S 또는 T), 28(X<sup>10</sup>=Y 또는 F), 34(X<sup>11</sup>=E 또는 K), 36(X<sup>12</sup>=K 또는 T), 37(X<sup>13</sup>=Q, T 또는 A), 46(X<sup>14</sup>=D 또는 E), 59(X<sup>15</sup>=S 또는 T), 60(X<sup>16</sup>=Q 또는 E), 62(X<sup>17</sup>=N 또는 K), 64(X<sup>18</sup>=T 또는 S), 75(X<sup>19</sup>=P 또는 K), 95(X<sup>20</sup>=K 또는 R), 98(X<sup>21</sup>=N, d 또는 E), 126(X<sup>22</sup>=S 또는 결실), 159(X<sup>23</sup>=R 또는 Q), 163(X<sup>24</sup>=T 또는 P), 170(X<sup>25</sup>=S 또는 K), 187(X<sup>26</sup>=L 또는 I), 190(X<sup>27</sup>=S 또는 P), 192(X<sup>28</sup>=S 또는 T), 193(X<sup>29</sup>=S 또는 T), 193(X<sup>29</sup>=H 또는 N), 197(X<sup>30</sup>=G 또는 A), 204(X<sup>31</sup>=S 또는 L), 222(X<sup>32</sup>=D 또는 N), 224(X<sup>33</sup>=T 또는 V), 247(X<sup>34</sup>=N 또는 D), 270(X<sup>35</sup>=N 또는 K), 272(X<sup>36</sup>=K 또는 E), 276(X<sup>37</sup>=R, Q 또는 K), 287(X<sup>38</sup>=D 또는 E), 290(X<sup>39</sup>=L 또는 I), 294(X<sup>40</sup>=K 또는 R), 309(X<sup>41</sup>=Q 또는 K), 327(X<sup>42</sup>=D 또는 N), 329(X<sup>43</sup>=L 또는 F), 330(X<sup>44</sup>=I 또는 V), 332(X<sup>45</sup>=T 또는 V), 333(X<sup>46</sup>=f, I 또는 L), 336(X<sup>47</sup>=K 또는 N) 및 338(X<sup>48</sup>=K 또는 Q).

[0031] LukA 및 LukB 류코시딘은 하나 이상의 추가적인 아미노산 삽입, 치환 또는 결실에 대해 각각 서열번호 2 내지 14 및 16 내지 27로 지정된 천연 폴리펩타이드와 다를 수 있으며, 예를 들어 서열번호 2 내지 14 및 16 내지 27 내 하나 이상의 아미노산 잔기는 기능적 동등물로 작용하는 유사한 극성의 다른 아미노산으로 치환될 수 있는데, 이는 침묵 변형을 초래한다. 즉, 천연 서열에 대한 변화는 천연 LukA 및 LukB의 기본 특성을 눈에 띄게 감소시키지 않았다. 예는 서열 번호 1 및 15를 포함한다. LukA 또는 LukB의 임의의 이러한 유사체는 천연 LukA 또는 LukB 활성을 유지하는지 여부를 결정하기 위하여 본 명세서에 개시된 프로토콜(예를 들어, 세포독성 분석 및 막 손상 분석)에 따라 스크리닝될 수 있다. 이들 류코시딘 내 치환은 아미노산이 속하는 클래스의 다른 구성 원으로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, 비독성(소수성) 아미노산은 알라닌, 류신, 아이소류신, 발린, 프롤린, 페닐알라닌, 트립토판, 및 메티오닌을 포함한다. 극성 중성 아미노산은 글라이신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴, 및 글루탐산을 포함한다. 양으로 하전된 (염기성) 아미노산은 아르기닌, 리신 및 히스티딘을 포함한다. 음으로 하전된 (산성) 아미노산은 아스파르트산 및 글루탐산을 포함한다.

[0032] 다른 실시형태에서, 비보존적 변경(예를 들어 하나 이상의 아미노산 치환, 결실 및/또는 첨가)은 LukA 및 LukB



를 불활성화 또는 해독하는 목적을 위해 만들어질 수 있다. 한 실시형태에서, 비독성 LukA 유사체는 위치 342 내지 351 내 C-말단의 아미노산이 결실된 천연 폴리펩타이드와 다르다. 서열번호 4 내지 6을 제외하고(이 위치에서 9개의 아미노산을 함유한다), 유사체는 10C-말단 아미노산 잔기가 없다. 총괄적으로, 이들 유사체는 LukA Δ10C로 언급된다. 해독된 LukA 및 LukB는 본 명세서에 설명되는 능동 백신 조성물 중에 사용될 수 있다. 분자적 변경은 단일 가닥 주형(Kunkel, Proc. Acad. Sci., USA 82:488-492(1985)), 이중 가닥 DNA 주형(Papworth, et al., Strategies 9(3): 3-4(1996))을 사용하는 플라스미드 주형 상의 프라이머 확장을 포함하는 당업계에 잘 알려진 방법에 의해, PCR 클로닝에 의해(Braman, J.(ed.), IN VITRO MUTAGENESIS PROTOCOLS, 2nd ed. Humana Press, Totowa, N.J.(2002)) 수행될 수 있다. LukA 또는 LukB 내 주어진 분자적 변경이 LukAB 세포독성을 감소시키는지 여부를 결정하는 방법은 본 명세서에 기재되어 있다.

[0033] 따라서, 앞서 언급한 관점에서, 본 발명의 목적을 위해, LukA는 서열번호 1 내지 14 중 어떤 것(예를 들어, 서열번호 2, 이는 스타필로코커스 아우레우스의 Newman 균주에 천연인 LukA 폴리펩타이드) 또는 그것과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 유사성을 가지는 (천연 또는 비천연) 폴리펩타이드에 대해 더 광범위하게 기재될 수 있다

[0034] 마찬가지로, 앞서 언급한 관점에서, 본 발명의 목적을 위해, LukB는 서열번호 15 내지 27 중 어떤 것(예를 들어, 스타필로코커스 아우레우스의 Newman 균주에 천연인 LukB 폴리펩타이드인 서열번호 27), 또는 그것과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 유사성을 가지는 (천연 또는 비천연) 폴리펩타이드에 대해 더 광범위하게 기재될 수 있다.

[0035] 따라서, 반대로 표시되지 않는다면, 천연 LukA 및 LukB의 미숙과 성숙 형태 둘 다, 및 천연 LukA와 100% 미만의 유사성을 가지는 서열(즉, 천연 서열 및 비슷한 유사체, 총괄적으로 본 명세서에서 "LukA" 및 "LukB"로 언급함)은 조성물 및 방법, 및 본 발명의 항LukA 및 항LukB 항체의 제조를 위해 사용될 수 있다.

[0036] **LukA 및 LukB을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 LukA 및 LukB를 합성 또는 분리하는 방법**

[0037] LukA 및 LukB 류코시딘은 당업계에 잘 알려진 재조합 DNA 방법을 통해 합성될 수 있다. 예를 들어, 스타필로코커스 아우레우스(Newman)(서열번호 2)의 LukA 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열(서열번호 28로 지정)은 이하에 제시된다. 이 폴리펩타이드를 암호화하는 축퇴 서열(예를 들어 재조합 발현의 목적을 위해 선택 숙주 내 코돈 선호도 면에서 유용할 수 있는 것), 및 다른 LukA 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 당업계에 공지되어 있으며, 또는 당업자에 의해 지정될 수 있다.

atgaaaaataaaaaacgtgttttaatagcgtcatcattatcatgtgcaatttttattgtta  
M K N K K R V L I A S S L S C A I L L L  
tcagcagcaacgactcaagcaaatcagctcataaagactctcaagacaaaaataagaaa  
S A A T T Q A N S A H K D S Q D Q N K K  
gaacatggtgataagtctcaacaaaaagacaaacgtaatgttactaataaagataaaaaat  
E H V D K S Q Q K D K R N V T N K D K N  
tcaacagcaccggatgatattgggaaaaacggtaaaatcacaaaacgaactgaaacagta  
S T A P D D I G K N G K I T K R T E T V  
tatgatgagaaaaaataatactccaaaatttacaattcgactttatcgatgatccaact  
Y D E K T N I L Q N L Q F D F I D D P T  
tatgacaagaatgtattacttgttaaaaaacaaggctcaattcattcaaatttaaagttt  
Y D K N V L L V K K Q G S I H S N L K F  
gaatctcataaagaagaaaaaaattcaaatggttaaagtatccaagtgagtaccatgta  
E S H K E E K N S N W L K Y P S E Y H V  
gattttcaagtaaaaaagaatcgtaaaactgaaatattagaccaattgocgaaaaataaa  
D F Q V K R N R K T E I L D Q L P K N K  
atttcaactgcaaaagtagacagtacattttcatatagctcaggtggtaaatcgattca  
I S T A K V D S T F S Y S S G G K F D S  
acaaaaggattggacgaacttcatcaaatagctactccaaaacgattagttataatcag  
T K G I G R T S S N S Y S K T I S Y N Q  
caaaattatgacacaattgccagcggtaaaaaataaactggcatgtacactggtcagtt  
Q N Y D T I A S G K N N N W H V H W S V  
attgccaatgacttgaagtatggtggagaagtgaaaaatagaaatgatgaattattatc  
I A N D L K Y G G E V K N R N D E L L F  
tatagaaatacagagaattgctactgtagaaaaccctgaactaagctttgcttcaaaatat  
Y R N T R I A T V E N P E L S F A S K Y  
agataccagcattagtaagaagtggctttaaaccagaatttttaacttatttatctaab  
R Y P A L V R S G F N P E F L T Y L S N  
gaaaagtcaaagagaaaaacgcaatttgaagtaacatacacacgaaatcaagatattttg  
E K S N E K T Q F E V T Y T R N Q D I L  
aaaaacagacctggaatacattatgcacctccaatttttagaaaaataaagatgggtcaa  
K N R P G I H Y A P P I L E K N K D G Q

[0038]

agattaattgtcacttatgaagttgattggaaaaataaaacagttaaagtcggttgataaa  
R L I V T Y E V D W K N K T V K V V D K  
tattctgatgacaataaaccttataaagaaggataa  
Y S D D N K P Y K E G

[0039]

[0040] 스타필로코커스 아우레우스(Newman)의 LukB 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열(본 명세서에서 서열번호 29로 지정), (서열번호 27)을 이하에 제시한다. 이 폴리펩타이드를 암호화하는 축퇴 서열(예를 들어 재조합 발현을 목적을 위해 선택 숙주 내 코돈 선호도 면에서 유용할 수 있는 것), 및 다른 LukA 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 당업계에 공지되어 있으며, 또는 당업자에 의해 지정될 수 있다.

atgattaacaactatgtaaaaaatocacaatttgtagcttagcactatcgactactttc  
M I K Q L C K N I T I C T L A L S T T F  
actgtattaccagctacttcatttgcaagattaattctgaaatcaaacaagtttctgag  
T V L P A T S F A K I N S E I K Q V S E  
aagaatccttgatgggtgataactaaaatgtatacacgtacagctacaacaagtgatagtcaa  
K N L D G D T K M Y T R T A T T S D S Q  
aaaaatattactcaaagcttacaatttaattttottaactgaacctaatatgataaagaa  
K N I T Q S L Q F N F L T E P N Y D K E  
acagtatttattaagcaaaaggtacaattggtagtgggttgagaatttttagaccctaat  
T V F I K A K G T I G S G L R I L D P N  
ggttattggaatagtagacattaagatggcctggatcttattcagtttcaattcaaaatggt  
G Y W N S T L R W P G S Y S V S I Q N V  
gatgacaacaacaatacaaatgtgactgactttgcaccaaaaaatcaggatgaatcaaga  
D D N N N T N V T D F A P K N Q D E S R  
gaagttaaatatacgtatgggtataaaaacaggtggagatttttcgattaatcgtggagggc  
E V K Y T Y G Y K T G G D F S I N R G G  
ttaactggaaatattacaaaagagagtaattattcagagacgattagttatcaacaacca  
L T G N I T K E S N Y S E T I S Y Q Q P  
tcatatcgtacattacttgatcaatctacgtcacataaaggtgtaggttgaaagtagaa

[0041]

S Y R T L L D Q S T S H K G V G W K V E  
gcacatttgataaataatgggacatgaccatacgagacaattaactaatgatagtgat  
A H L I N N M G H D H T R Q L T N D S D  
aatagaactaaaagtgaaattttttcttaacacgaaatggaaatttatggggcgaagat  
N R T K S E I F S L T R N G N L W A K D  
aatttcacacctaagacaaaatgcoctgtaactgtgtctgaagggtttaatcogaattt  
N F T P K D K M P V T V S E G F N P E F  
ttagctgttatgtoccatgataaaaaagacaaaggtaatcacaatttggtttcattat  
L A V M S H D K K D K G K S Q F V V H Y  
aaaagatcaatggatgagtttaaaatagattggaatcgccatgggtttctggggctattgg  
K R S M D E F K I D W N R H G F W G Y W  
tctggtgaaaaccatgtagataaaaaagaagaaaattatcagcattatagaagttgat  
S G E N H V D K K E E K L S A L Y E V D  
tggaagacacataatgtgaagtttgtaaaagtacttaatgataatgaaaagaataa  
W K T H N V K F V K V L N D N E K K -

[0042]

[0043]

LukA- 및 LukB-암호화 폴리뉴클레오타이드는 박테리아(대장균(*E. coli*)), 식물 또는 효모와 같은 숙주 내에서 발현될 수 있으며, 그 다음에 분리되고 정제된다. 대안으로, LukA 및 LukB 류코시딘은 표준 기법에 따라서 스타필로코커스 아우레우스 박테리아(예를 들어 Newman 균주)로부터 분리될 수 있다. 따라서, 이 류코시딘은 (천연 또는 비천연 환경으로부터) 분리될 수 있다. 그것들은 또한 스타필로코커스 아우레우스 LukA 및 LukB가 그것의 천연 상태(즉 스타필로코커스 아우레우스 세포 내 존재하는 단백질 및 세포 성분) 또는 비천연 상태(즉, 재조합 세포 숙주의 단백질 및 세포 성분)와 관련된 다른 단백질 및 세포 성분이 실질적으로 없도록 정제될 수 있다. 적어도 2개의 연속적 과정의 조합을 전형적으로 수반하는 적합한 정제 반응식은 당업계에 공지되어 있다. 문헌 [Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); 및 Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, N.Y. (1982)]을 참조하며, 친화도 컬럼 크로마토그래피 및 양이온 교환 액체 크로마토그래피와 같은 하나 또는 둘 이상의 표준 기법의 조합을 사용한다.

[0044]

**항LukA 항체 및 항LukB 항체**

[0045]

본 발명의 양태는 LukA와 특이적으로 결합하는 항LukA 항체, 및 LukB와 특이적으로 결합하는 항LukB 항체, 항체를 함유하는 치료 조성물 및 이들의 사용방법에 관한 것이다. 본 발명의 목적을 위하여, 용어 "항체"는 단클론성 항체, 다클론성 항체, 항체 단편, 및 유전적으로 유전자 조작된 형태의 항체, 및 이들의 조합을 포함한다. 더 구체적으로 용어 "항체"는 용어 "면역글로불린"과 상호호환적으로 사용되며, 전장(즉, 자연적으로 발생하

나 또는 정상 면역글로불린 유전자 단편 재조합 과정에 의해 형성된 면역글로불린 분자(예를 들어, IgG 항체) 및 또한 자연적으로 발생하거나 사실상 합성될 수 있는 이들의 면역적으로 활성인 단편(즉, 전장 면역글로불린 분자의 특이적 결합 부분을 포함)을 포함한다. 따라서, 용어 "항체 단편"은  $F(ab')_2$ ,  $F(ab)_2$ , Fab', Fab, Fv, scFv 등과 같은 일부의 항체를 포함한다. 구조와 관계없이, 항체 단편은 전장 항체에 의해 인식된 동일한 항원과 결합하고, 본 발명의 문맥에서, LukA, LukB 또는 LukAB 복합체와 특이적으로 결합한다. 항체 단편의 제조 및 스크리닝 방법은 당업계에 공지되어 있다.

[0046] 일부 실시형태에서, 본 발명의 항LukA 항체는 다른 스타필로코커스 류코시딘 S-서브유닛, 예컨대 HlgC, LukS-PVL, HlgA, LukS-I, LukE, LukEv, 및 LukM과 어느 정도의 교차 반응성을 가질 수 있다. 마찬가지로, 일부 실시형태에서, 본 발명의 항LukB 항체는 다른 스타필로코커스 F-서브유닛, 예컨대 LukF'-PV, LukF-PV, LukDv, LukD, LukF-I, 및 HlgB와 어느 정도의 교차 반응성을 가질 수 있다. 항LukA 및/또는 항LukB 항체는 각각 LukA 활성 및 LukB 활성을 억제하거나 감소시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 항LukA 및/또는 항LukB 항체는 각각 LukA 및 LukB 활성을 중화한다(예를 들어 실질적으로 제거한다).

[0047] 자연적으로 발생하는 항체는 2개의 동일한 중쇄 및 2개의 동일한 경쇄를 가지며, 각각의 경쇄는 쇠 사이의 이황화 결합에 의해 중쇄에 공유적으로 연결되고, 다수의 이황화 결합은 2개의 중쇄를 서로 추가로 연결한다. 개개의 쇠는 유사한 크기(110 내지 125개의 아미노산) 및 구조를 지니지만 상이한 기능을 지니는 도메인으로 폴딩될 수 있다. 경쇄는 하나의 가변 도메인(VL) 및/또는 하나의 불변 도메인(CL)을 포함할 수 있다. 중쇄는 또한 하나의 가변 도메인(VH) 및/또는, 항체의 분류 또는 아이소타입에 따라서 3 또는 4개의 불변 도메인(CH1, CH2, CH3 및 CH4)을 포함할 수 있다. 인간에서, 아이소타입은 IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM이며, IgA 및 IgG는 서브클래스 또는 서브타입으로 추가로 세분화된다(IgA1-2 및 IgG1-4).

[0048] 일반적으로 가변 도메인은 특히 항체 결합 부위 위치에서 한 항체로부터 다음으로 상당한 아미노산 서열 가변성을 나타낸다. 초가변 또는 상보성 결정 영역(complementarity-determining region, CDR)으로 불리는 3개의 영역은 각각의 VL 및 VH에서 발견되는데, 이는 프레임워크 가변 영역으로 불리는 덜 가변적인 영역에 의해 지탱된다. 본 발명의 항체는 IgG 단클론성 항체를 포함하지만 본 발명의 항체는 또한 항체 단편 또는 유전자 조작된 형태를 포함한다. 이들은, 예를 들어 Fv 단편, 또는 단백질이되, CDR 및/또는 예시된 항체의 가변 도메인은 단일-쇄 항체-결합 단백질로 유전자 조작된다.

[0049] VL 및 VH 도메인으로 이루어진 항체의 일부는 Fv(단편 가변성)로 지정되며, 항원 결합 부위를 구성한다. 단일 쇠 Fv(scFV 또는 SCA)는 하나의 폴리펩타이드 쇠 상에 VL 도메인 및 VH 도메인을 함유하는 항체 단편이되, 하나의 도메인의 N-말단 및 다른 도메인의 C-말단은 가요성 링커에 의해 결합된다. 단일 쇠 항체를 생산하기 위하여 사용된 펩타이드 링커는 전형적으로 가요성 펩타이드이며, VL 및 VH 도메인의 3차원 폴딩이 일어나는 것을 보증하도록 선택된다. 링커는 일반적으로 10 내지 50개의 아미노산 잔기이며, 일부 경우에, 예를 들어 약 10 내지 30개 아미노산 잔기, 또는 12 내지 30개 아미노산 잔기, 또는 심지어 15 내지 25개의 아미노산 잔기로 더 짧다. 이러한 링커 펩타이드의 예는 4개의 글라이신 잔기 다음에 세린 잔기의 반복을 포함한다.

[0050] 단일 쇠 항체는 그것이 유래된 전체 항체의 불변 도메인의 일부 또는 모두를 결여한다. 따라서, 그것은 전체 항체의 사용과 관련된 일부 문제를 극복할 수 있다. 예를 들어, 단일 쇠 항체는 중쇄 불변 영역과 다른 생물학적 분자 사이의 어떤 원치않는 상호작용이 없는 경향이 있다. 추가적으로, 단일 쇠 항체는 전체 항체보다 상당히 더 작으며 전체 항체보다 더 큰 투과성을 가질 수 있어서, 단일 쇠 항체가 국소화되고 표적 항원-결합 부위에 더 효율적으로 결합하도록 한다. 더 나아가, 단일 쇠 항체의 상대적으로 작은 크기는 수용인에서 전체 항체보다 원치않는 면역 반응을 유발할 가능성이 더 적다.

[0051] Fab(단편, 항원 결합)는 VL, CL, VH, 및 CH1 도메인으로 이루어진 항체의 단편을 말한다. 파파인 분해 후 생성된 것은 단순히 Fab로 언급되며, 중쇄 힌지 영역을 보유하지 않는다. 펩신 분해 후, 중쇄 힌지를 보유하는 다양한 Fab가 생성된다. 쇠간 이황화 결합이 있는 이들 단편은  $F(ab')_2$ 로 언급되는 한편, 단일 Fab'는 이황화 결합이 보유되지 않을 때 생긴다.  $F(ab')_2$  단편은 1가의 Fab 단편인 항원에 대해 더 높은 결합활성을 가진다.

[0052] Fc(단편 결정화)는 짝지어진 중쇄 불변 도메인을 포함하는 항체의 일부 또는 단편에 대한 지정이다. IgG 항체에서, 예를 들어 Fc는 CH2 및 CH3 도메인을 포함한다. IgA 또는 IgM 항체의 Fc는 CH4 도메인을 추가로 포함한다. Fc는 Fc 수용체 결합, 보체-매개 세포독성 및 항체-의존적 세포-세포독성(antibody-dependent cellular-cytotoxicity, ADCC)의 활성화와 관련된다. 다수의 IgG-유사 단백질의 복합체인 IgA 및 IgM과 같은 항체에 대해, 복합체 형성은 Fc 불변 도메인을 필요로 한다.

[0053] 최종적으로, 힌지 영역은 항체의 Fab 및 Fc 부분을 분리시키며, 서로에 대한 및 Fc에 대한 Fab의 이동성을 제공할 뿐만 아니라 2개 중쇄의 공유 결합을 위한 다수의 이황화 결합을 포함한다.

[0054] 항체 "특이성"은 항원의 특정 에피토프에 대한 항체의 선택적 인식을 말한다. 용어 "에피토프"는 면역글로불린 또는 T-세포 수용체에 특이적 결합가능한 또는 분자와 상호작용하는 것이 가능한 임의의 단백질 결정소를 포함한다. 에피토프 결정소는 일반적으로 아미노산 또는 탄수화물, 또는 당 측쇄와 같은 분자의 화학적 활성 표면기로 이루어지며, 일반적으로 특이적 3차원 구조의 특징뿐만 아니라 특이적 하전 특징을 가진다. 에피토프는 "선형" 또는 "입체형태"일 수 있다. 선형 에피토프에서, 해당 단백질과 해당 상호작용 분자(예컨대 항체) 사이의 상호작용의 모든 지점은 단백질의 주요 아미노산 서열에 따라서 선형으로 발생한다. 입체형태 에피토프에서, 상호작용 지점은 서로로부터 분리된 단백질 상의 아미노산 잔기에 걸쳐 발생하며, 즉 비연속적 아미노산은 단백질의 3차 폴딩에 의해 병치된다. 연속적 아미노산으로부터 형성된 에피토프는 전형적으로 변성 용매에 노출 시 보유되는 반면, 3차 폴딩에 의해 형성된 에피토프는 전형적으로 변성 용매로 처리 시 상실된다. 에피토프는 독특한 공간적 입체형태로 전형적으로 적어도 3개, 및 더 보통으로는, 적어도 5개 또는 8 내지 10개 아미노산을 포함한다. 동일한 에피토프를 인식하는 항체는 하나의 항체가 표적 항원에 다른 항체의 결합을 차단하는 능력을 나타내는 단순 면역분석으로 확인될 수 있다.

[0055] 본 발명의 단클론성 항체는 무린, 인간일 수 있고, 인간화되거나 키메라일 수 있다. 인간화된 항체는 한 종; 예를 들어 설치류, 토끼, 개, 염소, 말 또는 닭 항체(또는 임의의 다른 적합한 동물 항체)로부터 항체의 CDR이 설치류 항체의 중 및 경 가변 쇠로부터 인간 중 및 경 가변 도메인으로 전달되는 재조합 단백질이다. 항체 분자의 불변 도메인은 인간 항체의 불변 도메인으로부터 유래된다. 인간화된 항체의 제조방법은 당업계에 공지되어 있다. 키메라 항체는 바람직하게는 인간 항체 불변 영역으로부터 실질적으로 또는 배타적으로 유래된 불변 영역 및 인간 이외의 포유류의 가변 영역 서열로부터 실질적으로 또는 배타적으로 유래된 가변 영역을 가진다. 키메라화 과정은 또한 무린(또는 다른 비인간 포유류) 항체의 초가변 영역 또는 상보성 결정 영역(CDR) 이외의 가변 영역을 대응하는 인간 서열로 대체함으로써 더 효과적으로 만들어질 수 있다. CDR 이외의 가변 영역은 또한 가변 프레임워크 영역(FR)으로 알려져 있다. 본 발명의 또 다른 단클론성 항체는 이중 특이적이며, 즉 그것은 LukA와 LukB 둘 다에 대해 특이성을 가진다. 이중특이적 항체는 바람직하게는 인간이거나 또는 인간화되어 있다.

[0056] 상기 설명한 항체는 표준 기법에 따라서 얻을 수 있다. 예를 들어, LukA, LukB(이 용어는 본 명세서에서 사용되는 것과 같으며, LukAΔ10C와 같은 이들의 비독성 유사체를 포함한다) 또는 LukA 또는 LukB의 면역학적으로 활성인 단편은 피험자(예를 들어 인간 또는 마우스와 같은 포유류)에 투여될 수 있다. 류코시딘은 면역원으로서 단독으로 사용될 수 있으며 또는 담체 단백질 또는 다른 대상, 예컨대 세파로스 비드와 같은 비드에 부착될 수 있다. 포유류가 항체를 생산한 후, 항체 생산 세포, 예컨대 비장세포의 혼합물은 분리되며, 이로부터 다클론성 항체가 얻어질 수 있다. 다클론성 항체는 혼합물로부터 개개의 항체 생산 세포를 분리하는 단계 및, 예를 들어 그것을 골수종 세포와 같은 종양 세포와 융합시킴으로써 그것을 불멸하게 하는 단계에 의해 생산될 수 있다. 결과 하이브리도마는 배양물 중에 보존되며 단클론성 항체는 배양물 배지로부터 채취된다.

[0057] 단클론성 항체의 제조기법은 당업계에 잘 공지되어 있다. 재조합 단클론성 항체는 면역원(들)으로서 LukA, LukB 또는 LukAB를 사용하여 미국특허 출원 공개 2002/0009453호에 설명된 것과 유사한 방법으로 생산될 수 있다.

[0058] **치료 조성물**

[0059] LukA 및 LukB는 국소화된 급성 염증 질환을 포함하는 급성 염증 질환의 치료에서 항염증제로서 사용을 위해 치료 조성물로 조제될 수 있다. LukA 및 LukB는 또한 능동 백신으로서 사용을 위해 치료 조성물로 조제될 수 있다. 항LukA 및 항LukB 항체는 수동백신으로 사용을 위해 치료 조성물로 조제될 수 있다. 수동 및 능동 백신은 스타필로코커스 아우레우스 감염의 개시를 억제하기 위하여 예방적으로, 또는 스타필로코커스 아우레우스 감염, 특히 난치로 알려진 또는 특정 피험자의 경우에 다른 통상적인 항생제 치료에 의한 치료에 난치로 판명된 MRSA와 같은 스타필로코커스 아우레우스 감염을 치료하기 위하여 치료적으로 사용될 수 있다.

[0060] 치료 조성물이 능동 백신으로 사용을 위해 의도되는 실시형태에서, 감소된 독성을 나타내기 위하여 LukA 및/또는 LukB가 변경될 수 있다. 분자 변경은 상기 기재된다. 따라서, LukAΔ10C와 같은 이들의 비독성 유사체가 사용될 수 있다. 본 출원인은 비독성 면역원에 반응하여 생산된 항체가 독성, 천연 LukA 또는 LukB를 중화할 것을 믿는다. LukA 및 LukB의 독성을 감소시키는 목적을 위한 다른 변경은 화학적 처리(예를 들어 특이적 아미노산 잔기의 변형) 또는 다른 모이어티에 컨쥬게이션(예를 들어, 박테리아 다당류 또는 박테리아 글라이코단백질과 같은 다른 박테리아 항원에)을 포함한다. 불활성화 또는 해독작용(또는 독소 감소)의 목적을 위한 다른 스타필

로코커스 아우레우스 독소에 대한 화학적 변경은 공지되어 있다. 주어진 변경이 LukA 또는 LukB 독성을 감소시키는지 여부를 결정하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며 및/또는 본 명세서에 기재된다.

[0061] 본 발명의 치료 조성물은 LukA 및 LukB, 또는 항LukA 및 항LukB 항체를 약제학적으로 허용가능한 담체 및 선택적으로 약제학적으로 허용가능한 부형제와 함께 조제함으로써 제조된다. 본 명세서에 사용되는 용어 "약제학적으로 허용가능한 담체" 및 "약제학적으로 허용가능한 부형제"(예를 들어 희석제, 면역자극제, 보조제, 항산화제, 보존제 및 가용화제와 같은 첨가제)는 사용된 투약량 및 농도에서 그것에 노출된 세포 또는 포유류에 대해 비독성이다. 약제학적으로 허용가능한 담체의 예는, 예를 들어 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기산으로 완충된 물을 포함한다. 본 발명에 유용할 수 있는 약제학적으로 허용가능한 부형제의 대표적인 예는 항산화제, 예컨대 아스코르브산; 저분자량(약 10개 미만의 잔기) 폴리펩타이드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린; 보조제(미국특허 제6,355,625호에 기재된  $\beta$ -글루칸, 또는 과립구집락자극인자(granulocyte colony stimulating factor, GCSF)와 같이 보조제 유발 독성을 회피하도록 선택됨); 친수성 폴리머, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글라이신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 리신; 단당류, 이당류, 및 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 포함하는 다른 탄수화물; 킬레이트제, 예컨대 EDTA; 당 알코올, 예컨대 만니톨 또는 소르비톨; 염 형성 반대이온, 예컨대 나트륨; 및/또는 비이온성 계면활성제, 예컨대 TWEEN(등록상표), 폴리에틸렌 글라이콜(PEG), 및 PLURONICS(등록상표)를 포함한다.

[0062] 본 명세서의 다른 곳에 기재된, 본 발명의 치료 조성물은 적어도 하나의 추가적인 활성제를 추가로 함유할 수 있다.

[0063] 본 발명의 치료 조성물은 동결건조된 조제물 또는 수용액의 형태로 원하는 순도를 가지는 활성 성분(들)을 약제학적으로 허용가능한 담체 및 선택적 부형제 및/또는 추가적인 활성제와 혼합함으로써 보관을 위해 제조될 수 있다.

[0064] **치료 조성물의 용도 -- 적응증**

[0065] **급성 염증 질환**

[0066] 염증은 병원균(예를 들어, 박테리아 및 바이러스), 손상된 세포 및 자극물과 같은 유해한 침입성의 자극을 제거하고, 치유를 개시하기 위한 보호적 생물학적 반응으로서 일반적으로 이해된다. 염증은 더 구체적으로 손상에 대해 혈관신생된 살아있는 조직의 반응으로서 이해된다. 이와 같이, 염증은 물리적, 화학적 또는 생물학적 인자(agent)에 의해 야기된 손상 또는 비정상적 자극에 반응하는 이화된 혈관 및 인접한 조직의 세포학적 및 화학적 반응의 기본 고정 개념이다. 염증은 보통 손상 부위에서 체액 및 혈액 세포의 축적을 야기하며, 보통 치유 과정이다. 염증 과정이 없다면, 상처와 감염은 치유되지 않으며, 조직의 진행적 파괴는 생명을 위협하게 된다. 급성 염증은 침입성의 자극에 대한 신체의 초기 반응을 말하며, 손상된 또는 감염된 조직에 혈장 및 백혈구의 보충을 수반한다. 장기간의 염증은 또한 만성 염증으로 언급되며, 염증 부위에 존재하는 면역 세포의 유형이 점진적으로 변화하고, 염증 과정으로부터의 조직의 동시 파괴 및 조직 치유를 특징으로 한다.

[0067] 그러나, 염증은 보통 정상적인 염증 과정의 역기능을 통해 때때로 유해함을 야기한다. 염증 질환은 염증을 야기하고, 염증으로부터 초래되거나, 염증에 의해 영향받게 되는 것을 특징으로 하는 것에 관계된 것이다. 용어로서 "급성 염증 질환"이 본 명세서에서 사용되며, 보통의 의학적 용어에 따라서 빠른 개시 및 중증의 증상을 가지는 염증 질환을 말한다. 환자의 정상 상태로부터 염증 증상이 심하게 나타나는 상태 개시 기간은 일반적으로 약 72 시간까지 지속된다. 급성 염증 질환은 만성 염증 질환과 대조적인데, 만성 염증 질환은 장기간의 염증 질환이며, 변화가 거의 없거나 느린 진행을 보여주는 질병을 나타낸다. 급성과 만성 질환 사이의 구별은 의료업계의 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0068] 급성 단계의 염증뿐만 아니라 급성 염증 장애에 수반된 주된 면역 세포는 단핵 세포(예를 들어 염증에 반응하여 대식세포로 분화하는 단핵구); 수지상 세포, 및 호중구(염증 부위로 이동)를 포함한다. 이 면역세포는 히스타민, 인터페론-감마, 인터류킨-8, 류코트라이엔 B4, 산화질소 등과 같은 염증 매개자를 방출시키고, 박테리아, 바이러스 및 세포 파편(식균 작용으로 알려진 과정)을 섭취함으로써 염증 반응을 돕는다. 이 세포는 당업계에서 총괄적으로 식세포로 알려져 있다.

[0069] 본 출원인은 LukAB가 인간 식세포를 표적화하고 사멸시키며, 이 LukAB-매개 세포독성은 이 세포에 실질적으로 특이적이지만 다른 유핵 포유류 세포에는 그렇지 않다는 것을 발견하였다. 임의의 특정 작동 이론에 구속되도록 할 의도는 없지만, 본 출원인은 LukA/LukB 복합체가 식세포를 침윤하는 혈장 막 상의 구멍을 형성하여서, 세포사를 야기하고, 따라서 염증을 감소시킨다는 것을 믿는다. 따라서, 본 발명의 항염증 조성물은 원인, 예를 들어

임의의 박테리아 또는 바이러스 감염에 상관없이 인간과 같은 포유류 내 급성 염증 질환을 치료하는 것에 유용할 수 있으며, 바람직한 실시형태에서, 급성 염증 질환을 국소화한다. 이러한 질환의 다른 예는 알레르기성 접촉 피부염, 급성 과민증, 급성 신경 염증 손상(예를 들어 급성 감염에 의해 야기됨), 급성 심근경색증, 심폐우회술로부터 생기는 급성 뉴런손상, 및 박테리아 또는 바이러스 감염에 의해 야기되는 급성, 국소화된 항염증 질환을 포함한다.

[0070] 바람직한 실시형태에서, 급성 염증 질환은 피부 또는 연조직 내 감염 상처이다. 본 발명으로 치료될 수 있는 상처는 살아있는 조직의 펑크, 절단 또는 찢어짐의 형태일 수 있다. 피부의 상처는 표피, 진피 또는 전층 피부 상처의 경우 피하 조직을 관통할 수 있다. 따라서 본 발명의 치료 조성물로 치료될 수 있는 상처는, 예를 들어 개심수술 후 깊은 흉골 상처 및 복부 및 임의의 다른 유형의 수술 후의 수술 후 상처를 포함한다. 다른 상처는 예컨대 총, 칼, 또는 피부를 절개하거나 찢을 수 있는 임의의 다른 물체에 의한 외상으로부터 초래된 것이다. 약품의 부작용으로서 또는 다양한 병적 측면(예를 들어 카포시 육종과 관련된 포자낭균)뿐만 아니라 내부 상처(예를 들어 치열, 및 위장관에 대한 상처 또는 병변, 예컨대 위 또는 장 내 궤양)의 증상으로서 생기는 상처가 또한 본 발명에 의해 치료될 수 있다.

[0071] 본 발명의 치료 조성물에 의해 치료될 수 있는 또 다른 급성 염증 질환은 결막염, 홍채염, 포도막염, 중심 망막염, 외이도염, 급성 화농성 중이염, 유양돌기염, 미로염, 만성 비염, 급성 비염, 부비동염, 인두염, 편도선염, 접촉성 피부염, 피부 괴사, 당뇨병성 신경병증, 다발성 근염, 화골성 근염, 퇴행성 관절염, 류마티스 관절염, 건관절주위염, 및 변형성 골염을 포함한다.

[0072] **스타필로코커스 아우레우스 감염**

[0073] 본 발명은 또한 치료가 필요한 포유류 피험자에게 항체 조성물을 투여함으로써 스타필로코커스 아우레우스 감염의 개시를 억제하거나 스타필로코커스 아우레우스 감염을 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명의 목적에 대해, 표적 피험자 집단은 스타필로코커스 아우레우스에 의해 감염되거나 감염 위험에 있는 포유류, 예컨대 인간을 포함한다. 일부 실시형태에서, 치료되는 피험자는 MRSA를 포함하는 스타필로코커스 아우레우스로 감염되며 및/또는 항생제 또는 다른 치료제로 이미 처리되었지만, 치료되지 않았다.

[0074] **치료적 유효량**

[0075] 급성 염증 질환 치료의 내용에서, LukA 및 LukB의 양은 치료가 증상 수의 감소, 적어도 하나의 증상의 중증도의 감소, 또는 적어도 하나의 증상의 추가 진행의 지연, 또는 심지어 급성 염증 질환의 전체적인 경감 중 어떤 하나 이상을 이룰 수 있는 의미에서 치료적 유효량이다.

[0076] 스타필로코커스 아우레우스 감염과 관련된 수동 또는 능동 백신으로서 치료적 조성물의 용도의 내용에서, LukA 및 LukB, 또는 항LukA 및 항LukB 항체의 치료적 유효량은 또한 조성물 투여가 스타필로코커스 아우레우스 감염의 위험에 있는 피험자에서, 및 스타필로코커스 아우레우스로 감염된 포유류 피험자에 대해 스타필로코커스 아우레우스 감염의 억제 또는 방지, 증상 수의 감소, 적어도 하나의 증상 중증도의 감소, 또는 적어도 하나의 증상의 추가적인 진행의 지연, 또는 심지어 감염의 전체적인 경감 중 어떤 하나 이상을 이룰 수 있는 의미에서 예방적으로 유효하다.

[0077] 광범위하게, LukA, LukB, 및 항LukA 및 항LukB 항체의 치료적 유효량은, 예를 들어 조성물 내 이런 활성제의 농도, 투여방식 및 빈도, 급성 염증 질환의 중증도 또는 치료되어야 하는(또는 예방되어야 하는) 스타필로코커스 아우레우스 감염, 및 연령, 체중 및 전반적인 건강상태, 면역 상태와 같은 피험자 정보를 포함하는 다수의 인자를 고려하여 표준 과정에 따라서 결정될 수 있다. 일반적 가이드는, 예를 들어 의약품국제조화협력회의(International Conference on Harmonization)의 공보 및 문헌[REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Publishing Company 1990)]에서 찾을 수 있다. 투약량이 원하는 또는 필요한 예방적 또는 치료적 효과를 제공하는 것에 도달할 때까지 임상되는 LukA 및 LukB 또는 항LukA 및 항LukB 항체를 투여할 수 있다. 이 치료과정은 통상적인 분석에 의해 용이하게 모니터링될 수 있다.

[0078] LukA 및 LukB의 치료적 유효량은 전형적으로 용량 당 또는 1일 기준으로 LukA 및 LukB 각각의 1 내지 400 $\mu$ g 범위에 있다. 바람직하게는, LukA 및 LukB의 양은 실질적으로 동일하다. 항체 조성물의 치료적 유효량은 용량 당 또는 1일 기준으로 전형적으로 킬로그램 체중(mg/kg) 당 적어도 50mg, 예를 들어 적어도 100mg/kg, 적어도 150mg/kg, 적어도 200mg/kg, 적어도 250mg/kg, 적어도 500mg/kg, 적어도 750mg/kg 및 적어도 1000mg/kg이다. 단클론성 항체 조성물에 대한 투약량은 더 낮은 경향이 있으며, 예컨대 비단클론성 항체 조성물의 약 1/10, 예컨대 적어도 약 5mg/kg, 적어도 약 10mg/kg, 적어도 약 15mg/kg, 적어도 약 20mg/kg, 또는 적어도 약 25mg/kg이다.

**[0079] 투여 방식**

**[0080]** 투여 전, 본 발명의 치료 조성물은 동결건조 및 복원 전 또는 후 멸균될 수 있는데 이는 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 용이하게 수행될 수 있다. 치료 조성물은 멸균 접근 포트를 가지는 용기, 예를 들어 정맥주사 용액 주머니 또는 피하주사기 바늘로 뚫을 수 있는 마개를 가지는 바이알 내에 위치될 수 있다.

**[0081]** 항염증 조성물은 허용된 의학적 실행에 따라서 임의의 수의 경로로 투여될 수 있다. 바람직한 방식은 당업계에 공지된 기법을 사용하여 정맥 내, 근육내, 피하 및 경피적 투여를 포함한다. 다른 투여방식이 생각될 수 있다. 편재화된 급성 염증 질환 치료의 경우에, 치료 조성물이 급성 염증 부위에 또는 급성 염증 부위 주변에 투여되는 비전신 투여가 바람직하다.

**[0082] 병용 치료**

**[0083]** 일부 실시형태에서, 치료되어야 하는 급성 염증 질환 또는 스태필로코커스 아우레우스 감염의 특성에 의존하여 치료 조성물은 다른 활성제와 함께 병용치료의 부분으로서 투여된다. 이러한 추가적인 활성제는 항감염제, 항생제, 및 항미생물제를 포함한다. 본 발명에서 유용할 수 있는 대표적인 항감염제는 반코마이신 및 리소스타핀을 포함한다. 본 발명에 유용할 수 있는 대표적인 항생제 및 항미생물제는 페니실리나제 내성 페니실린, 세팔로스포린 및 카바페넴을 포함하며, 반코마이신, 리소스타핀, 페니실린 G, 암피실린, 옥사실린, 나프실린, 클록사실린, 디클록사실린, 세팔로틴, 세파졸린, 세팔렉신, 세프라딘, 세파만돌, 세폭시틴, 이미페넴, 메로페넴, 겐타마이신, 테이코플라닌, 린코마이신 및 클린다마이신을 포함한다. 이 항생제의 투약량은 당업계에 잘 공지되어 있다. 예를 들어 문헌[MERCK MANUAL OF DIAGNOSIS AND THERAPY, Section 13, Ch. 157, 100<sup>th</sup> Ed. (Beers & Berkow, eds., 2004)] 참조. 항염증제, 항감염제, 항생제 및/또는 항미생물제는 투여 전 조합될 수 있고, 또는 본 발명의 치료 조성물과 동시에(동일 조성물의 부분으로서 또는 상이한 조성물의 방법으로) 또는 순차적으로 투여될 수 있다.

**[0084]** 일부 실시형태에서, 항LukA 및/또는 항LukB 항체 조성물은 다가이며, 즉 다른 박테리아 항원에 특이적으로 결합하는(다른 박테리아 항원을 선택적으로 중화시키는) 항체를 또한 함유한다. 항체는 또한 백신 조성물의 내용에서 본 명세서에 기재된 임의의 항원에 특이적으로 결합할 수 있다. 따라서, 예를 들어 다른 항체는 스태필로코커스 아우레우스 5형, 스태필로코커스 아우레우스 8형, 스태필로코커스 아우레우스 336, 류코시딘 성분, 예컨대 PVL(개개의 PVL 서브유닛, LukS-PV 및 LukF-PV를 포함) 감마-용혈소 서브유닛(HlgA, HlgB 및 HlgC), 스태필로코커스 아우레우스로부터의 LukE 또는 LukD, 스태필로코커스 아우레우스로부터의 LukM 또는 LukF'-PV, 리포테이코산(LTA) 및 접착성 매트릭스 분자를 인식하는 미생물 표면 성분(microbial surface component recognizing adhesive matrix molecule, MSCRAMM) 단백질을 포함하는 다당류 또는 글라이코단백질에 특이적으로 결합할 수 있다.

**[0085] 치료 섭생**

**[0086]** 본 발명의 치료 조성물은 1회 용량으로, 또는 다회 용량 프로토콜에 따라서 투여될 수 있다. 예를 들어 상대적으로 적은 용량의 치료 조성물은 예컨대 1 또는 2회 용량으로 투여된다. 통상적인 항생제 치료를 포함하는 실시형태에서, 이는 일반적으로 며칠 또는 몇 주에 걸쳐 다회 용량을 수반하며, 항생제는 시간 기간 동안 1일 1, 2 또는 3 또는 그 이상의 횟수로, 예컨대 적어도 5일, 10일 또는 심지어 14일 또는 그 이상 동안 취해질 수 있는 한편, 항체 조성물은 보통 단지 1회 또는 2회 투여된다. 그러나, 치료 조성물 및 항생제의 상이한 투약량, 투약 시간 및 상대적 양은 당업자에 의해 선택되고 조절될 수 있다.

**[0087] LukAB-매개 세포독성의 억제제 및 더 적은 독성을 가지는 LukA 및 LukB의 변경 형태의 확인방법**

**[0088]** 항LukA 및 항LukB 항체, 및 이들의 단편뿐만 아니라 다른 잠재적 치료 모이어티(예를 들어, 작은 유기 분자)는 LukAB-매개 세포독성을 억제하는 그것의 활성을 평가하기 위해 다양한 방법(분석 포맷 또는 스크리닝을 포함)으로 사용될 수 있다. 이하에 기재하는 바와 같이, 이 방법은 LukAB-매개 세포독성 및 인간 식세포의 용해를 야기하는 사건의 캐스케이드의 일부 양태를 억제하는 작용제를 확인하도록 설계된다. 해당 방법은 또한 그것의 본래의 대응부분에 대해 감소된 독성을 소유하는 LukA 및 LukB의 변경 형태를 확인하도록 설계된다. 캐스케이드의 부분인 표적화된 사건은, 예를 들어 식세포 막에 LukA의 결합, LukA에 LukB의 결합(LukAB 올리고머화), 및 LukAB 올리고머에 의해 형성된 막 구멍의 차단을 포함한다. 분석 포맷은 일반적으로 인간 식세포(또는 이것의 LukAB 막 결합 부분), 적합한 배양물 배지, 및 정제된 LukA 또는 정제된 LukA 및 LukB를 필요로 한다.

**[0089]** 당업자는 다음의 프로토콜이 단지 예시적이며 반응조건, 검출가능한 표지 및 장치(예를 들어, 검출 및 정량화를



위한 기기)의 선택과 같은 다양한 작업 변수가 적절하게 변형될 수 있다는 것을 인식할 것이다.

- [0090] 다음의 방법은 일반적으로 영향받는 캐스케이드 내 정확한 사건을 필수적으로 드러내지 않고 LukAB 세포독성을 억제하는 작용제를 확인하는 단계에 관한 것이다.
- [0091] LukAB 세포독성의 억제제를 확인하기 위하여, 10%의 열 불활성화 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)으로 보충한 최종 용적 50 $\mu$ l의 RPMI(Gibco) 내 5 $\times$ 10<sup>3</sup> 세포/웰로 384-웰의 깨끗한 바닥 검정색 조직 배양물 처리 플레이트(Corning) 내에서 인간 식세포(예를 들어, PMN-HL60 세포)를 플레이팅할 수 있다. 그 다음에 세포를 시험 화합물/분자(~5 $\mu$ l/상이한 농도)와 접촉시키고/혼합하며/반응시키고/처리할 수 있고, 이어서 LukA 및 LukB로 중독시키며, 바람직한 실시형태에서 이를 실질적으로 정제하고(5 $\mu$ l의 ~0.001-2 $\mu$ M 용액), 예를 들어, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>에서 1시간 동안 LukA 및 LukB에 의한 식세포의 중독을 가능하게 하는 배양 조건 하에 바람직하게 함께 첨가하였다. 대조군으로서, 세포를 배양물 배지(100% 생존)로 및 0.1% v/v Triton X100(100% 사멸)으로 처리할 수 있다.
- [0092] 이 실시형태에서 상기 기재한 바와 같이 처리한 세포를 그 다음에 세포 생존력을 모니터링하기 위한 염료, 예컨대 CellTiter(Promega)(세포의 대사 활성의 정량화에 의해 배양물 내 살아있는 세포의 수를 측정함으로써 흡광도를 통해 세포 생존력을 결정할 수 있다)와 함께 인큐베이션 할 수 있고, 추가적인 시간 기간 동안 인큐베이션한다(예를 들어, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>에서 약 2시간). 그 다음에 세포 생존력을 플레이트 판독기, 예를 들어 Envision 2103 Multi-label Reader(Perkin-Elmer)를 사용하여 492nm에서 비색계 반응을 측정함으로써 결정할 수 있다. 생존 세포%를 예컨대 다음의 식을 사용하여 계산할 수 있다: 생존력% = 100  $\times$  [(Ab<sub>492</sub>샘플 - Ab<sub>492</sub>Triton X)/(Ab<sub>492</sub>조직 배양물 배지)]. 100% 생존력의 증가는 LukAB 세포독성의 억제를 시사한다.
- [0093] 이 분석의 변형은 막 손상 분석으로 언급된다. 이 실시형태에서, 상기 기재한 바와 같이 처리한(예를 들어, 시험 화합물/분자로 세포를 처리하는 단계 및 이어서 정제된 LukA로 세포를 중독시키는 단계를 포함하는 그 이하의) 세포를 이어서, SYTOX Green(0.1 $\mu$ M; Invitrogen)과 같은 세포 비투과성 형광 염료와 함께(제조업자의 설명서에 따라) 인큐베이션할 수 있고, 예를 들어 어둠 속 실온에서 추가 15분 동안 인큐베이션할 수 있다. 막 손상의 지표로서 형광은 그 다음에 여기 485, 발광 535nm에서 Envision 2103 Multilabel Reader(Perkin-Elmer)와 같은 플레이트 판독기를 사용하여 측정될 수 있다. 형광의 감소는 LukAB 세포독성의 억제를 시사한다.
- [0094] 전체로서 이 분석은 인간 식세포에 대한 LukAB 세포독성 효과를 억제하거나 감소시키는 화합물의 확인을 용이하게 한다.
- [0095] 특히 상기 방법이 억제 활성을 나타낸다면 상기 기재한 방법과 독립적으로 또는 상기 기재한 방법과 함께 추가적인 방법이 사용될 수 있으며, 생화학적 캐스케이드 사건이 작용제에 의해 영향받거나 표적화된 것을 당업자가 더 명확히 결정할 수 있을 것이다. 이 사건은 식세포 막에 LukA의 결합, LukA에 LukB의 결합(LukB 올리고머화), 및 LukAB 올리고머에 의해 형성된 막 구멍의 차단을 포함한다.
- [0096] **표적 세포에 LukA 결합의 억제제에 대한 스크리닝**
- [0097] 중독 과정의 제1 단계가 되는 것으로 믿어지는 표적 세포에 LukA 결합을 차단하거나 감소시키는 억제제에 대한 스크리닝을 위하여, 10%의 열 불활성화 소태아혈청(FBS)으로 보충한 최종 용적 50 $\mu$ l의 RPMI(Gibco) 내 2.5 $\times$ 10<sup>3</sup> 세포/웰로 384-웰의 깨끗한 바닥 검정색 조직 배양물 처리 플레이트(Corning) 내에서 인간 식세포(예를 들어, PMN-HL60 세포)를 플레이팅할 수 있다. 그 다음에 세포를 시험 화합물/분자(~5 $\mu$ l/상이한 농도)로 처리하였고, 정제되고, 형광으로 표지된 LukA(예를 들어, FITC, Cy3, Cy5, APC, PE) 5 $\mu$ l의 ~0.01-2 $\mu$ M 용액으로 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>에서 1시간 동안 중독시킬 수 있다. 시험 화합물/분자의 효능을 평가하기 위하여, 세포 관련 형광을, 예를 들어 고 컨텐츠 스크리닝(high content screening) 및 고 컨텐츠 분석(예를 들어, Cellomics ArrayScan HCS Reader(Thermo Scientific)(여기 485nm, 발광 535nm))을 위해 설계된 자동화된 형광 현미경 이미징 시스템을 사용하여 세포에 LukA 결합의 지표로서 측정할 수 있다.
- [0098] **LukA-LukB 올리고머화/상호작용의 억제제에 대한 스크리닝**
- [0099] 중독 과정에서 제2 단계가 되는 것으로 믿어지는 LukA/LukB 상호작용을 차단하거나 감소시키는 억제제에 대한 스크리닝을 위해, 10%의 열 불활성화 소태아혈청(FBS)으로 보충한 최종 용적 50 $\mu$ l의 RPMI(Gibco) 내 2.5 $\times$ 10<sup>3</sup> 세포/웰로 384-웰의 깨끗한 바닥 검정색 조직 배양물 처리 플레이트(Corning) 내에서 인간 식세포(예를 들어,

PMN-HL60 세포)를 플레이팅할 수 있다. 그 다음에 세포를 시험 화합물/분자로 처리할 수 있고, 이어서 정제된 LukA와 정제된 LukB의 혼합물로 중독시켰으며, 이때 LukB는 FITC, Cy3, Cy5, APC, 및 PE와 같은 형광 분자로 형광으로 표지하였고, 중독 과정이 완료되도록 둔다(예를 들어 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 1시간 동안). 시험 화합물/분자의 효능을 평가하기 위하여, 예를 들어 고 컨테츠 스크리닝 및 고 컨테츠 분석(예를 들어, Cellomics ArrayScan HCS Reader(Thermo Scientific)(여기 485nm, 발광 535nm))을 위해 설계된 자동화된 형광 현미경 이미징 시스템을 사용하여 세포-결합 LukB-FITC 형광을 세포에 LukA 결합의 지표로서 측정할 수 있다.

**[0100] LukAB 구멍 형성의 억제제에 대한 스크리닝**

**[0101]** LukAB 구멍 형성을 차단하거나 억제하는 억제제에 대한 스크리닝을 위하여, 10%의 열 불활성화 소태아혈청(FBS)으로 보충한 최종 용적 50 $\mu$ l의 RPMI(Gibco) 내 2.5 $\times$ 10<sup>3</sup> 세포/웰로 384-웰의 깨끗한 바닥 검정색 조직 배양물 처리 플레이트(Corning) 내에서 세포 용해를 야기하는 효과기 분자, 인간 식세포(예를 들어, PMN-HL60 세포)를 플레이팅할 수 있다. 그 다음에 세포를 시험 화합물/분자(상이한 농도를 함유하는 ~5 $\mu$ l)로 처리할 수 있고, 이어서 정제된 LukAB(~0.001-2 $\mu$ M)로 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 10분 동안 중독시켰다. 대조군으로서, PMN-HL60 세포를 배양물 배지(음성 대조군) 및 0.1% v/v Triton X100(양성 대조군)으로 처리할 수 있다.

**[0102]** 숙주 세포의 표면 상에서 LukAB 구멍을 직접적으로 평가하기 위하여, 브롬화에티뮴(EB) 유입 분석을 사용할 수 있다. EB는 건강한 숙주 세포에 비투과성인 작은 양이온성 염료이다. LukAB에 의한 양이온성 구멍의 형성 시, EB는 세포 내로 들어가 DNA에 결합하는데, 이것은 형광을 초래한다. 이 방식으로 처리한 세포는 그 다음에 실온의 어둠 속에서 추가 5분 동안 EB(5  $\mu$ M)와 함께 인큐베이션할 수 있다. LukAB 구멍 형성 억제에서 시험 화합물/분자의 효능을 평가하기 위하여, 여기 530nm, 발광 590nm에서 Envision 2103 Multilabel Reader(Perkin-Elmer)와 같은 플레이트 판독기를 사용하여 구멍 형성의 지표로 형광을 측정할 수 있다. 이 분석은 LukAB 구멍을 차단하거나 억제할 수 있는 분자의 확인을 용이하게 하는데, 이는 LukAB-매개 독성을 완화할 것이다.

**[0103] 스태필로코커스 아우레우스 임상적 분리주에 의한 LukAB의 생산을 측정하는, 감염의 중증도를 예측하는 방법**

**[0104]** 본 발명의 또 다른 추가 양태는 감염된 피험자로부터 얻은 생물학적 샘플 내 LukA 및/또는 LukB, 또는 이들의 대응하는 유전자의 존재 또는 양을 검출하는 단계를 수반하는 스태필로코커스 아우레우스 감염 중증도의 예측 또는 평가방법에 관한 것이다. 따라서, LukA 및/또는 LukB의 거의 없는 또는 검출가능하지 않은 양을 생산하는 대조군(예를 들어 스태필로코커스 아우레우스 균주 USA100 및 USA400)에 비해 상대적으로 높은 양의 LukA 및/또는 LukB의 검출, 또는 이들의 대응하는 유전자(예를 들어 스태필로코커스 아우레우스 균주 Newman, 4645, 및 MRSA 균주 USA300 및 USA500)의 검출은 중증 감염의 지표이다. LukA 및/또는 LukB의 상대적 양의 검출 또는 존재에 대해, 참고는 도 4A의 도시로 만들어질 수 있다. 해당 방법의 대표적인 실시형태는 이하에 기재한다.

**[0105] LukA 및 LukB 수준을 판정하기 위한 면역블롯 분석**

**[0106]** LukAB 수준(즉, LukAB 생산)을 판정하기 위하여, 생물학적 샘플, 예를 들어 유체(예를 들어 혈액) 또는 조직 샘플을 감염된 피험자로부터 얻은 후, 적합한 배양 조건에 배양물을 노출시켜 스태필로코커스 아우레우스를 성장시키고, 배양물 상청액을 얻었으며, 그것으로부터 박테리아 단백질을 분리시키고, LukA 및/또는 LukB를 확인한 다음, LukA 및/또는 LukB를 정량화하였다. 더 구체적으로, 한 실시형태에서 임상적 분리주 균주를 선택할 수 있고, 적합한 조건 하에, 예를 들어 37°C에서 180rpm으로 진탕하면서 12 내지 18시간 동안 적합한 배양물 배지, 예를 들어 1% 카사미노산으로 보충한 Royal Park Memorial Institute 배양물 배지 1640(RPMI; Invitrogen) 중에서 성장시켰다. 그 다음에 원심분리를 통해 침전시켰고, 배양물 상청액을 수집하였다. 이어서 배양물 상청액(~30 $\mu$ l)을 10 $\mu$ l의 SDS-래플리(Laemmli) 완충제와 혼합하고 95°C에서 10분 동안 비등시킬 수 있다. 그 다음에 단백질을, 예를 들어 15% SDS-PAGE 겔을 사용하여 분리한 다음, 고체 지지체, 예를 들어 나이트로셀룰로스 막에 옮길 수 있다. 후속하여 막을 LukA 또는 LukB에 대한 항체(예를 들어, 토끼 다클론성 항체)와 함께 인큐베이션할 수 있고, LukA 또는 LukB의 존재를 형광단에 컨쥬게이트된 2차 항체(예를 들어, AlexaFluor-680에 컨쥬게이트된 항-토끼 항체; Invitrogen)로 항체-LukA/항체-LukB 복합체를 검출함으로써 시각화할 수 있다. 그 다음에 막을 건조시킬 수 있고, 예를 들어 Odyssey 적외선 이미징 시스템(LI-COR Biosciences)을 사용하여 건조시키고 스캔하여 LukA 및 LukB의 양을 결정할 수 있다.

**[0107] LukA 및/또는 LukB 유전자의 존재를 판정하기 위한 중합효소 연쇄 반응(Polymerase chain reaction, PCR)**

**[0108]** LukAB을 암호화하는 유전자의 존재를 판정하기 위하여, 감염된 피험자로부터 생물학적 샘플을 얻은 후, 적합한 배양 조건에 배양물을 노출시켜 스태필로코커스 아우레우스를 성장시키고, 배양한 스태필로코커스 아우레우스로

부터 핵산을 추출한 다음, PCR 또는 다른 적합한 증폭 프로토콜을 사용하며, LukA 및/또는 LukB-특이적 프라이머를 사용하고, LukA 및/또는 LukB를 검출하는 적어도 1회의 핵산 증폭을 수행한다. 따라서 한 대표적인 실시형태에서, 초기 샘플 제조 후 임상적 분리주 균주는 37°C에서 1.5% 한천으로 고형화한 고체 배지, 예를 들어 트립신 대두 브로스(tryptic soy broth, TSB) 상에서 성장시킬 수 있다. 그 다음에 스타필로코커스 아우레우스 콜로니를 선택하고, 예를 들어 37°C에서 10분 동안 TSM 완충제(100mM TRIS pH7, 500mM 수크로스, 10mM MgCl<sub>2</sub>) 내 2 mg/ml 라이소스타핀(AMBI PRODUCTS LLC)으로 효소적으로 분해할 수 있다. 이어서 샘플을 원심분리하고, 상청액을 버리며, 펠렛을 100 $\mu$ l 멸균수와 함께 재현탁한 후, 100°C에서 5분 동안 비등시키고, 원심분리할 수 있다. 상청액은 출발 물질 및 LukA 및/또는 LukB-특이적 프라이머를 사용하는 PCR과 같은 증폭 반응을 위한 DNA 주형을 제공한다.

[0109] **작업 실시예**

[0110] 본 발명은 이제 다음 비제한적 실시예에 대해 참고로 기재할 것이다. 달리 특정되지 않는다면, 모든 부분은 중량이다.

[0111] **실시예 1: 천연 조건 하 재조합 LukA 및 LukB의 발현 및 정제: pMAL 발현 시스템**

[0112] 다음의 프라이머를 사용하여 55°C 어닐링 온도로 표준 PCR 셋팅 하에 Taq 폴리머라제에 스타필로코커스 아우레우스 DNA로부터 LukA 및 LukB 유전자를 증폭시켰다: LukA에 대해 5'-ccc-GTCGAC-tta-TCCTTCTTTATAAGGTTTATTGTC-3'(서열번호 30) 및 5'-ccc-GAAGGATTTACATCATCATCATCACAAATTCAGCTCATAAAGACTCTC-3'(서열번호 31) 및 LukB에 대해 5'-CCCCGAAGGATTTCaCATCATCATCATCACAAAGATTAATTCTGAAATCAAACAAG-3'(서열번호 32) 및 5'-ccc-GTCGAC-tta-TTCTTTTCATTATCATTAAGTACTT-3'(서열번호 33). LukA 및 LukB 유전자 산물을 NdeI 및 SalI(New England BioLabs)로 분해하였고 pMAL-c4X 벡터(New England BioLabs)에 결합하였다. 구성체를 대장균 균주 DH5 $\alpha$ 로 형질전환하였고, 플라스미드 삽입물을 시퀀싱을 통해 확인하였다. 배양물이 ~0.5의 A<sub>600</sub>에 도달할 때까지 형질전환주를 37°C에서 100 $\mu$ l/ml의 암피실린 및 0.2% 글루코스와 함께 테리픽 브로스(Terrific Broth) 중에서 성장시켰다. 6-his-태그 MBP-LukA 또는 6-his-태그 MBP-LukB의 발현을 16°C에서 밤새 180rpm으로 진탕하면서 0.3mM 아이소프로필  $\beta$ -D-1-티오갈락토피라노사이드(IPTG)로 유도하였다.

[0113] 유도 후, 4000rpm, 4°C에서 20분 동안 원심분리를 통해 세포를 채취하였고, EDTA가 없는 프로테아제 억제제(Roche)를 보충한 빙냉 컬럼 완충제((20mM Tris-HCL, 200mM NaCl, 및 1mM EDTA) 중에서 재현탁하였다. 박테리아 세포를 1분 동안 얼음 상에서 초음파처리하였다(10sec 펄스). 샘플을 10,000rpm, 4°C에서 30분 동안 원심분리하였고, 상청액을 수집하였으며 아밀로스 수지 컬럼에 적용하였다. 컬럼을 컬럼 완충제로 2회 세척하였고, 정제된 6-his-태그 MBP-LukA 또는 6-his-태그 MBP-LukB를 10mM 말토스로 보충한 컬럼 완충제로 10 분획 중에서 용리하였다.

[0114] **실시예 2: 재조합 활성 LukA, LukA $\Delta$ 10C,  $\Delta$ 33NLukA 및 LukB 독소의 발현 및 정제: pET14b 발현 시스템**

[0115] 다음의 프라이머를 사용하여 55°C 어닐링 온도로 표준 PCR 셋팅 하에 Vent 폴리머라제(New England BioLabs)로 스타필로코커스 아우레우스 LukA, LukA $\Delta$ 10C,  $\Delta$ 33NLukA 및 LukB 유전자를 증폭시켰다: LukA에 대해 5'-cccc-CTCGAG-AATTCAGCTCATAAAGACTCTCAAG-3'(서열번호 34) 및 5'-cccc-GGATCC-tta-TCCTTCTTTATAAGGTTTATTGTC-3'(서열번호 35); LukA $\Delta$ 10C에 대해 5'-CCCC-CTCGAG-AATTCAGCTCATAAAGACTCTCAAG(서열번호 34) 및 5'-cccc-GGATCC-tta-ATATTTATCAACGACTTTAACTG(서열번호 36);  $\Delta$ 33NLukA에 대해 5'-cccc-CTCGAG-TCAACAGCACCGGATGATATTG(서열번호 37) 및 5'-cccc-GGATCC-tta-TCCTTCTTTATAAGGTTTATTGTC(서열번호 35); LukB에 대해 5'-cccc-CTCGAG-AAGATTAATTCTGAAATCAAACAAG-3'(서열번호 38) 및 5'-cccc-GGATCC-tta-TTCTTTTCATTATCATTAAGTACTTT-3'(서열번호 39). 유전자 산물을 XhoI 및 BamHI(New England BioLabs)로 분해하였고 유전자의 5'-영역에 히스티딘-태그의 암호화 서열을 융합하는 pET14b 벡터(Novagen)에 결합하였다. 발현 플라스미드를 대장균 균주 DH5 $\alpha$ 로 형질전환하였고, 플라스미드 삽입물을 시퀀싱을 통해 확인하였다. 플라스미드를 정제하였고 발현 대장균 균주 T7 lysY/lq(New England BioLabs)로 형질전환하였다.

[0116] 변성 조건 하에 정제를 위해, 배양물이 ~0.5의 A<sub>600</sub>에 도달할 때까지 형질전환주를 37°C에서 100 $\mu$ g/ml의 암피실린과 함께 테리픽 브로스 중에서 성장시켰다. 37°C에서 3시간 동안 180rpm으로 진탕하면서 0.4mM IPTG로 6-his-태그 LukA 또는 6-hisLukB의 발현을 유도하였다. 유도 후, 세포를 4000rpm, 4°C에서 15분 동안 원심분리를 통해 채취한 다음, 1X TBS(50mM Tris, 150mM NaCl, pH 7.5) 중에서 재현탁하였다. 박테리아 세포를 2분 동안 얼음 상에서 초음파처리하였다(10sec 펄스). 초음파처리한 박테리아를 50,000rpm에서 30분 동안 초원심분리하였다.

펠렛을 라이시스 버퍼(100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM Tris, 8M 우레아, pH 8.0) 중에서 재현탁하였고, 로티세리 (rotisserie) 상에서 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 샘플을 13,000rpm에서 30분 동안 원심분리하였고, 상청액을 Ni-NTA 수지(Qiagen)를 함유하는 컬럼에 적용하였다. 컬럼을 세척 완충제(100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM Tris, 8M 우레아, pH 6.3)로 2회 세척하였고, 단백질을 pH 5.9 및 pH 4.5에서 용리 완충제(100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM Tris, 8M 우레아)를 사용하여 컬럼으로부터 용리하였다. SDS-PAGE로 측정된 바와 같이 정제 단백질을 함유하는 분획을 모으고, 트리스 완충 식염수(TBS; 500mM Tris, 1.5M NaCl, pH 7.5) 중에서 1:1로 희석하였으며, 4°C TBS 중에서 밤새 투석하여 우레아를 제거하고, 재폴딩시켰다. Thermo Scientific Pierce BCA 단백질 분석 키트를 사용하여 정제한 6-his-태그 LukA 및 LukB를 정량화하였다.

[0117] 천연 조건하에 정제를 위해, 배양물이 ~0.5의 A600에 도달할 때까지 형질전환주를 37°C에서 100µg/ml의 암피실린과 함께 Luria-Bertani Broth 중에서 성장시켰다. 25 내지 30°C에서 3시간 동안 220rpm으로 진탕하면서 0.05-0.1mM IPTG로 6-his-태그 LukA, 6-his-태그 LukAΔ10C, 6-his-태그 Δ33NLukA 또는 6-hisLukB의 발현을 유도하였다. 유도 후, 세포를 4000rpm, 4°C에서 15분 동안 원심분리를 통해 채취한 다음, 1X TBS(50mM Tris, 600mM NaCl, pH 7.5) 중에서 10mM 이미다졸 및 HALT EDTA가 없는 프로테아제 억제제 콕테일(Thermo Scientific)과 함께 재현탁하였다. 박테리아 세포를 얼음 상에서 초음파처리 하였다. 초음파처리한 박테리아를 20,000rpm에서 20분 동안 초원심분리하였다. 상청액을 로티세리 상에서 1시간 동안 4°C에서 Ni-NTA 수지(Qiagen)와 함께 인큐베이션하였다. 샘플을 컬럼에 적용하였고, 컬럼을 25mM 이미다졸과 함께 세척 완충제 1X TBS(50mM Tris, 600mM NaCl, pH 7.5)로 세척하였다. 단백질을 용리 완충제 1X TBS(50mM Tris, 600mM NaCl, pH 7.5) 중에서 50-500mM 이미다졸을 사용하여 컬럼으로부터 용리하였다. SDS-PAGE로 측정된 바와 같이 정제한 단백질을 함유하는 분획을 모았고, 1X TBS(50mM Tris, 150mM NaCl, pH 7.5) 중에 1:1로 희석하였으며, 4°C에서 밤새 1X TBS 중에서 투석하였다. 정제된 6-his-태그 LukA 및 LukB를 Thermo Scientific Pierce BCA 단백질 분석 키트를 사용하여 정량화하였다.

[0118] **실시예 3: 변성된 재조합 LukA 및 LukB의 발현 및 정제**

[0119] 다음의 프라이머를 사용하여 55°C 어닐링 온도로 표준 PCR 셋팅 하에 Vent 폴리머라제(New England BioLabs)로 스타필로코커스 아우레우스 DNA로부터 LukA 및 LukB 유전자를 증폭시켰다: LukA에 대해 5'-ggg-CATATG-AATTCAGCTCATAAAGACTCTCAA-3'(서열번호 40) 및 5'-ccc-GTCGAC-TCCTTCTTATAAGGTTTATTGTC-3'(서열번호 41) 및 LukB에 대해 5'-ggg-CATATG-AAGATTAATTCTGAAATCAAACAAG-3'(서열번호 42) 및 5'-ccc-GTCGAC-TTCTTTTCATTATCATTAAAGTACTT-3'(서열번호 43). LukA 및 LukB 유전자 산물을 NdeI 및 SalI(New England BioLabs)로 분해하였고 pET41b 벡터(Novagen)로 결합하였다. 우선 구성체를 DH5α 세포로 형질전환한 다음, 대장균 발현 균주 ER2566(New England BioLabs)로 형질전환하였다. 형질전환주를 카나마이신 25µg/ml와 함께 테리픽 브로스 중에 37°C에서 2.5시간 동안 성장시키고, LukA 및 LukB의 발현을 37°C에서 2시간 동안 180rpm으로 진탕하면서 0.3mM IPTG로 LukA 또는 LukB의 발현을 유도하였다. 세포를 펠렛화하였고, 1X TBS(500mM Tris, 1.5 M NaCl, pH 7.5) 중에서 재현탁하였으며, 얼음 상에서 1분 동안 초음파처리하였다(10sec 펄스). 초음파처리한 박테리아를 50,000rpm에서 30분 동안 초원심분리하였다.

[0120] 변성 조건 하에 C-말단의 6-his-태그 LukA 및 LukB를 정제하기 위하여, 펠렛을 라이시스 버퍼(100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM Tris, 8M 우레아, pH 8.0) 중에서 재현탁하였고, 로티세리 상에서 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 샘플을 13,000rpm에서 30분 동안 원심분리하였고, 상청액을 Ni-NTA 컬럼에 적용하였다. 컬럼을 세척 완충제(100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM Tris, 8M 우레아, pH 6.3)로 2회 세척하였고, LukA 및 LukB를 pH 5.9 및 pH 4.5에서 용리 완충제(100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM Tris, 8M 우레아)를 사용하여 컬럼으로부터 용리하였다. 정제한 6-his-태그 LukA 및 LukB를 BioRad DC 단백질 분석을 사용하여 정량화하였다.

[0121] **실시예 4: 항LukA 및 항LukB 다클론성 항체의 생산**

[0122] 프로인트 완전 보조제(Freund's Complete Adjuvant, FCA) 중에서 에멀전화한 변성 재조합 LukA(250µg)를 뉴질랜드 백색종 토끼에 주사하였다. 이십일(21)일 및 사십구(49)일째에 불완전 프로인트 보조제(Incomplete Freund's Adjuvant, FCA) 중에서 에멀전화한 재조합 LukA(125µg)로 동물을 부스팅하였다.

[0123] 프로인트 완전 보조제(FCA) 중에서 에멀전화한 변성 재조합 LukB(250µg)를 뉴질랜드 백색종 토끼에 주사하였다. 이십일(21)일 및 사십구(49)일째에 불완전 프로인트 보조제(FCA) 중에서 에멀전화한 재조합 LukB(125µg)로 동물을 부스팅하였다.

- [0124] 실시예 5: 류코시딘 A/B는 대부분 막 파괴를 통해 인간 식세포의 세포독성 매개 사멸을 초래한다
- [0125] 사용한 세포주
- [0126] LukAB가 인간 식세포를 표적화하고 사멸시키는 방법을 연구하기 위한 모델로서, HL-60 세포(ATCC CCL-240, 인간 전골수성 세포주)를 사용하였다. 37°C에서 5% CO<sub>2</sub>와 함께 10%의 열 불활성화 소태아혈청(FBS)으로 보충한 RPMI 배지(Gibco) 중에서 HL-60 세포를 성장시켰다. 호중구 유사 세포(PMN-HL60) 내로 HL-60을 분화시키기 위하여, 배양물을 1.5%(v/v) 다이메틸설폭사이드(DMSO)로 보충하였고 4일 동안 성장시켰다.
- [0127] 사용한 방법/분석
- [0128] 세포 독성 분석
- [0129] 스타필로코커스 아우레우스 류코시딘 AB(LukAB), PMN-HL60 세포로 증독시킨 후 포유류 세포의 생존력을 평가하기 위하여 10%의 열 불활성화 소태아혈청(FBS)으로 보충한 100 $\mu$ l의 RPMI(Gibco)의 최종 부피로 1 $\times$ 10<sup>5</sup> 세포/웰에서 96-웰 편평 바닥 조직 배양물 중에서 플레이팅하였다. 3회로 20% 내지 0.16% v/v의 범위에서 스타필로코커스 아우레우스 균주 Newman으로부터의 배양물 여과액의 단계적 2배 희석에 의해 세포를 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 2시간 동안 증독시켰다. 야생형 균주로부터의 외부단백질 및 LukAB이 없는 균주(돌연변이 균주)로부터의 외부단백질을 사용하여 실험을 수행하였다. 100% 생존력에 대한 대조군은 20% v/v 조직 배양물 배지(RPMI+10% 열 불활성화 소태아혈청), 및 20% v/v 스타필로코커스 아우레우스 성장 배지(RPMI+가사미노산)를 포함하였다. 0.1% v/v Triton X100을 100% 세포사를 위한 대조군으로 사용하였다. 증독시킨 후, 10  $\mu$ l의 CellTiter(Promega)를 각 웰에 첨가하였고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 추가 3시간 동안 인큐베이션하였다. CellTiter는 대사적으로 활성인 세포(색 변화), 죽은 세포 내에서 상실된 특성을 모니터링한다. Perkin Elmer Envision 2103 Multilabel Reader를 사용하여 492 nm에서 비색 반응을 측정하였다. 다음의 식을 사용하여 살아있는 세포%를 계산하였다: 생존력% = 100  $\times$  [(Ab<sub>492</sub> 샘플 - Ab<sub>492</sub>Triton X)/(Ab<sub>492</sub>조직 배양물 배지)].
- [0130] 막 손상 분석
- [0131] LukAB-매개 세포독성을 측정하기 위한 대안의 분석은 숙주 세포막의 완전함을 평가하는 것이다. 이를 위하여, SYTOX green(Invitrogen) 투과성 분석을 사용하였다. 건강한 세포는 SYTOX에 비투과성이지만, 일단 세포막 완전함이 위태로워지면 염료에 투과성이 된다. 세포 내부로, SYTOX Green은 DNA에 결합하며 강한 형광을 나타낸다.
- [0132] LukAB로 증독시키거나 또는 스타필로코커스 아우레우스 균주로 생체 밖 감염시킨 후 숙주 세포막의 완전함을 평가하기 위하여, 10%의 열 불활성화 소태아혈청(FBS)으로 보충한 100 $\mu$ l 최종 부피 RPMI(Gibco) 내 1 $\times$ 10<sup>5</sup> 세포/웰로 96-웰 편평 바닥 조직 배양물 처리 플레이트(Corning) 내에서 PMN-HL60 세포를 플레이팅하였다. 세포를 20% 내지 0.16% v/v의 범위에 있는 스타필로코커스 아우레우스 균주 Newman의 배양물 여과액의 희석으로 증독시키거나 또는 3회로 1 내지 100 범위의 MOI로 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 2시간 동안 감염시켰다. 야생형 균주 및 LukAB가 없는 균주(돌연변이체 균주)를 사용하여 실험을 수행하였다. 배경 형광에 대한 대조군은 20% v/v 조직 배양물 배지(RPMI+10% 열-불활성화된 소태아 혈청) 및 20% v/v 스타필로코커스 아우레우스 성장 배지(RPMI+가사미노산)를 포함하였다. 증독 또는 감염 후, 세포를 96-웰 v-바닥 플레이트(Corning)에 옮겼고, 1500rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 상청액을 버리고 펠렛을 100 $\mu$ l의 PBS + SYTOX Green(0.1 $\mu$ M; Invitrogen) 중에서 재현탁하였다. 그 다음에 세포를 96-웰 깨끗한 바닥의 검정색 조직 배양물 처리 플레이트(Corning)에 옮겼고, 실온의 어둠 속에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 형광을 Perkin Elmer Envision 2103 Multilabel Reader(여기 485nm, 발광 535nm)를 사용하여 측정하였다.
- [0133] 결과
- [0134] LukAB는 인간 주요 식세포를 표적화하며 사멸시킨다
- [0135] 스타필로코커스 아우레우스 균주 Newman으로부터 여과된 배양물 상청액에 의한 최초 인간 주변 단핵세포(primary human peripheral mononuclear cell, PBMC)(도 3의 A), 단핵구, 대식세포, 수지상 세포(도 3의 B) 및 다형핵 세포(polymorphonuclear cell, PMNs)(도 3의 C)의 증독은 세포독성분석(도 3의 A 내지 C)으로 시험한 강한 세포사를 초래하였다. 스타필로코커스 아우레우스 균주 Newman 결여-용혈소(h1a),  $\gamma$ -용혈소(h1g), 류코시딘 E/D(LukED) 또는 류코시딘 A/B(LukAB)으로부터 여과된 배양물 상청액에 의한 이들 세포의 증독은 h1a-, h1g-, 및 LukED-음성 균주로부터의 외부단백질이 Newman 야생형(WT) 균주(세포 독성 분석으로 시험)만큼 세포독성이

라는 것을 나타내었으며, 이는 Newman에 의해 생산된 앞서 기재한 류코톡신 중 어떤 것도 이들 세포의 세포독성-매개 사멸에 기여하지 않는다는 것을 나타낸다(도 3의 A 내지 C). 대조적으로, 세포를 LukAB가 없는 균주 Newman( $\Delta lukAB$ )으로부터의 외부단백질로 중독시켰을 때 세포사가 거의 없다는 것을 관찰하였다. LukAB가 없는 균주 Newman에 의한 세포독성 활성의 결여는 플라스미드 내 트랜스 위치로 lukAB 유전자를 제공함으로써 구조되었다( $\Delta LukAB/pLukAB$ )(도 3의 C). 중요하게는, 이 표현형은 정제된 재조합 LukA 및 LukB를 중독시킴으로써 결정되는 LukAB에 완전히 의존한다. 개개의 서브유닛은 PMN에 대해 검출가능한 세포독성을 나타내었다(도 3의 D). 대조적으로, 서브유닛 둘 다의 조합은 용량 의존적 방식으로 이들 세포에 대해 강한 세포독성을 초래하였다(도 3의 D). 전체적으로, 이 결과는 LukAB가 스태필로코커스 아우레우스가 최초 인간 식세포, 감염성 작용제에 대해 숙주를 보호하기 위해 필요한 중요한 면역 세포를 표적화하고 사멸시키는 능력을 초래한다 것을 증명한다.

[0136] LukAB는 인간 식세포를 사멸시킨다

[0137] 스태필로코커스 아우레우스 균주 Newman으로부터 여과된 배양물 상청액에 의한 호중구 유사 세포주(PMN-HL60) 및 대식세포 유사 세포주(THP1+PMA)의 중독은 세포 독성 분석으로 시험한 바와 같이 강한 세포사를 초래하였다(도 3). 스태필로코커스 아우레우스 WT 및 동질유전자 세포독성 돌연변이체 균주(h1a, h1gABC, LukED, 및 LukAB)로부터의 여과된 배양물 상청액으로 이들 세포의 중독은 세포 독성 분석에 의해 측정된 바와 같이 LukAB가 이들 세포를 사멸시키는 스태필로코커스 아우레우스의 능력을 초래한다는 것을 나타내었다(도 4의 A 및 B). LukAB가 없는 균주 Newman에 의한 세포독성 활성의 결여는 LukAB가 없는 균주 Newman을 lukAB를 발현시키는 플라스미드로 형질전환함으로써 구조되었다( $\Delta lukAB/pLukAB$ )(도 4의 C). 이 균주로부터의 외부단백질은 PMN-HL60 세포와 THP-1+PMA 세포 둘 다에 대해 극도로 세포독성인데, LukAB는 인간 세포를 표적화하고 사멸시키는 강한 스태필로코커스 독소라는 강한 증거를 제공한다.

[0138] 스태필로코커스 아우레우스 배양물 상청액 내 존재하는 다른 인자의 분포를 추가로 제외하기 위하여, PMN-HL60 세포를 정제된 재조합 LukA 또는 LukB로 중독시켰다. 개개의 서브유닛은 PMN-HL60에 대해 검출가능한 세포독성이 없다는 것을 나타내었다(도 3의 D). 대조적으로, 서브유닛 둘 다의 조합은 용량 의존적 방식으로 이들 세포에 대해 강한 세포독성을 초래하였다(도 3의 D). PMN-HL60 및 THP-1+PMA 세포에 추가로, PMN-HL60이 (HL60)으로부터 분화된 혈구전구세포, THP-1+PMA가 (THP-1)로부터 분화된 단핵구전구세포, 림프구(HuT 및 Jurkat 세포), 및 상피세포(293T 및 HepG2)를 포함하는 몇몇 다른 인간 세포주가 또한 재조합 LukAB로 중독되었다(도 4의 E). 이 결과는 LukAB가 인간 식세포를 우선적으로 표적화하고 사멸시키며, 인간 림프구 또는 상피세포에서 효과가 없다는 것을 증명한다. 이들 결과는 함께 LukAB가 식세포의 스태필로코커스 아우레우스-매개 사멸에 중요한 역할을 한다는 것을 증명한다.

[0139] LukAB는 스태필로코커스 아우레우스의 임상적 관련 균주에 의해 생산된다

[0140] LukB에 대해 상승된 다클론성 항체에 의한 면역블롯 분석은 LukB가 병원- 및 지역사회성 감염과 관련된 MRSA 균주를 포함하는 일련의 스태필로코커스 균주에 의해 생산된다는 것을 나타내었다(USA300, 400, 및 500; 도 5의 A). 중요하게는, LukB 수준은 이 균주의 세포독성 표현형과 관련된다(도 5의 A 및 B). 높은 수준의 LukB를 생산하는 균주(예를 들어, Newman, 4645, USA 500, 및 USA 300)는 낮은 또는 검출가능하지 않은 LukB(예를 들어, USA100 및 USA400)를 생산하는 균주보다 PMN-HL60 세포에 대해 더 세포독성이었다(도 5의 B). MRSA 균주 내 LukAB의 역할을 조사하기 위하여, LukAB 동질유전자 돌연변이체는 임상적 분리주 USA 타입 300 LA 클론으로 만들었다(도 5의 C). 균주 Newman에서 알 수 있는 바와 같이, LukAB가 없는 균주 USA300으로부터의 외부단백질은 모 균주로부터의 외부단백질보다 현저하게 세포독성이 더 적었다(도 5의 D). 이들 데이터는 LukAB가 MRSA 균주로 생산되는 중요한 세포독성이라는 것을 증명한다. LukAB는 인간 식세포의 막을 손상시킨다.

[0141] 스태필로코커스 아우레우스로부터의 외부단백질에 의한 PMN-HL60의 중독은 세포 라운딩 및 핵 팽창, LukAB에 의존적인 표현형을 초래하였다(도 6의 A). 이 세포 라운딩 및 팽창 표현형은 막 손상 분석(Membrane Damage Assay)으로 결정되는 바와 같이 증가된 막 투과성과 관련된다(도 6의 B 및 C). 중요하게는, LukAB-음성 균주로부터의 외부단백질은 막 투과성, 플라스미드로부터 LukAB를 생산함으로써 구조되는 표현형(도 6의 B) 및 재조합 LukAB에 거의 내지 전혀 효과가 없음을 나타내었지만, 개개의 독소 서브유닛은 용량 의존적 방식으로 막 손상을 야기하지 않았다(도 6의 C). 더 나아가, 메티실린-민감 스태필로코커스 아우레우스(MSSA) 균주와 메티실린-내성 스태필로코커스 아우레우스(MRSA) USA300 균주 둘 다에 의한 최초 인간 PMN의 감염은 LukAB-의존적 막 손상을 초래하였다(도 6의 D). 이 결과는 LukAB가 생체막 감염 동안 숙주 세포의 혈장 막을 손상시킨다는 것을 증명한다.

[0142] LukAB는 식세포를 표적화하고 사멸시킴으로써 숙주-매개 사멸로부터 스태필로코커스 아우레우스를 보호한다.

- [0143] 스타필로코커스 아우레우스 WT,  $\Delta$ LukAB 및 lukAB 발현 플라스미드를 은닉하는  $\Delta$ LukAB( $\Delta$ LukAB/pLukAB)에 의한 PMN-HL60의 감염은 막 손상 분석에 의해 측정되는 바와 같이 LukAB가 스타프-식세포 상호작용 동안 식세포 막을 파괴하는 스타필로코커스 아우레우스의 능력에 필요하다는 것을 나타낸다(도 7의 A). 중요하게는, WT 균주보다 더 많은 막 손상을 나타낸 LukAB를 과생산하는 스타필로코커스 아우레우스( $\Delta$ LukAB/pLukAB)는(도 7의 A) LukAB가 숙주 세포 막을 강하게 손상시킨다는 것을 증명한다. 인간 전혈(도 7의 B) 및 정제된 최초 인간 호중구(PMN; 도 7의 C)의 감염은 lukAB-음성 스타프가 WT 균주와 비교하여 더 효율적으로 사멸시킨다는 것을 나타내었다(도 7의 B 및 C). 중요하게는,  $\Delta$ LukAB-음성 스타프로 나타낸 약화된 표현형을 lukAB 발현 플라스미드로 구조화하였다(도 7의 B 및 C). 스타필로코커스 아우레우스 WT,  $\Delta$ LukAB, 및 lukAB 발현 플라스미드를 함유하는  $\Delta$ LukAB 돌연변이체 균주의 배양물 여과액으로 최초 인간 PMN의 중독은 LukAB가 최초 인간 PMN을 표적화하고 사멸시킨다는 것을 나타낸다(도 7의 D). 이들 데이터는 LukAB가 막 파괴를 통해 PMN을 표적화하고 사멸하는 강한 스타필로코커스 세포독소이며, 따라서 PMN-매개 사멸로부터 스타필로코커스 아우레우스를 보호한다는 것을 강하게 나타낸다.
- [0144] LukAB는 생체내 스타필로코커스 아우레우스의 발병에 기여한다.
- [0145] 루시퍼라제 리포터 구성체를 그것(pLukAB-Xen1)에 융합된 LukAB 프로모터와 함께 함유하는 스타필로코커스 아우레우스로 역 케도로 감염시킨 마우스는 신농양에서 LukAB 프로모터 활성을 나타내었으며, 이때 프로모터가 없는 리포터(pXen1)는 활성을 나타내지 않는다(도 8의 A). 이 데이터는 LukAB가 신농양의 감염 모델에서 생체 내에서 발현된다는 것을 증명한다. 추가로, 마우스를 스타필로코커스 아우레우스 WT로 역 케도로 감염시켰지만 LukAB가 없는 스타필로코커스 아우레우스 균주는 신장의 광대한 균집화를 나타내지 않았다. LukAB-음성 균주에서 관찰되는 균집화 결함은 트랜스 위치에서 LukAB를 제공함으로써 WT 수준으로 회복되었다(도 8의 B). 이 데이터는 함께 LukAB가 박테리아의 발병에 기여하는 중요한 스타필로코커스 세포독소라는 것을 나타낸다.
- [0146] LukAB는 폴리에틸렌 글라이콜로 차단할 수 있는 표적 세포막 상의 구멍을 형성한다.
- [0147] 제조합체 LukAB(rLukAB)에 의한 PMN-HL60 세포의 중독은 rLukA와 rLukB가 둘 다 LukA 및 LukB 특이적 항체에 의한 면역블롯을 통해 결정되는 바와 같이 표적 세포에 결합한다는 것을 나타내었다(도 9의 A). 또한 형광-활성화 세포 분류(fluorescence-activated cell sorting, FACS) 및 His 특이적 항체를 사용하여 PMN-HL60에 6His-태그된 rLukAB의 결합을 확인하였다(도 9의 B). 또한 제조합 독소로 중독 후 PMN-HL60 막 상의 면역블롯을 통해 rLukAB 올리고머를 검출하였으며, 이는 LukAB가 표적 세포막 상에서 더 고차의 구조를 형성한다는 것을 나타낸다(도 9의 C). 중요하게는, rLukAB에 의한 PMN-HL60의 중독은 LukAB가 폴리에틸렌 글라이콜(PEG) 분자를 사용하여 차단할 수 있는 표적 세포 막 상에서 브롬화에티뎀 투과성 구멍을 형성한다는 것(도 9의 D), 및 LukAB 구멍을 차단하는 것이 세포 생존력을 증가시킨다는 것(도 9의 E)을 증명하였다. 더 나아가, 사포닌에 의해 PMN-HL60 막 중에 형성된 구멍이 PEG로 차단되지 않기 때문에 PEG는 LukAB 구멍을 특이적으로 차단하고, 그 결과 이들 세포는 구멍-매개 사멸로부터 보호되지 않는다. 이들 데이터는 LukAB 구멍이 소분자에 의해 차단될 수 있고 LukAB 구멍을 차단하는 것은 LukAB-매개 사멸로부터 세포를 보호할 수 있다는 것을 증명한다.
- [0148]  $\alpha$ -LukA 다클론성 항체에 의한 스타필로코커스 아우레우스 배양물 여과액 세포독성의 중화
- [0149] 2마리의 상이한 토끼에서 생성한 다양한 양의  $\alpha$ -LukA 다클론성 항체로 사전 인큐베이션한 스타필로코커스 아우레우스 배양물 여과액에 의한 PMN-HL60의 중독은 용량 의존적 방식으로 배양물 여과액의 감소된 독성을 초래하였다(도 10). 배양물 여과액이 면역 전 혈청과 함께 사전인큐베이션하였을 때 이 중화 효과는 나타나지 않았다. 중요하게는, 2마리의 상이한 토끼에서 발생한 항체가 매우 유사하게 거동하며, 늦은 출혈로부터 항체의 중화효과를 초기 출혈로부터 항체의 중화 효과와 비교할 때 알 수 있는 바와 같이 항체의 중화 능력은 성숙함을 증가시켰다(도 10). 이 데이터는 스타필로코커스 아우레우스로부터 배양물 여과액으로 나타나는 세포독성이  $\alpha$ -LukA 다클론성 항체로 중화될 수 있다는 것을 보여준다.
- [0150]  $\alpha$ -LukA 다클론성 항체로 여전히 인식되는 비세포독성 LukA 절단 돌연변이체의 확인.
- [0151] LukA는 다른 스타필로코커스 류코톡신 S-서브유닛과 다르며, 즉 N- 및 C-말단 둘 다에서 확장이 있다. 이 확장은 N-말단에서 33개의 아미노산 및 C-말단에서 10개 아미노산으로 이루어진다(도 11a). 정제된 rLukB와 조합한 N-말단 확장이 없는 정제된 제조합 LukA(rA33NLukA)에 의한 PMN-HL60의 중독은 정제된 rLukA+rLukB의 중독과 비교하여 세포에 대해 강한 세포독성을 초래하였다(도 11b). 그러나 rLukB와 조합하여 C-말단 확장이 없는 정제된 제조합 LukA(rLukA $\Delta$ 10C)에 의한 PMN-HL60의 중독은 세포독성 효과를 초래하지 않았다(도 11b). 이들 데이터는 N-말단의 확장이 LukA의 세포독성 효과에 불필요하지만 C-말단의 확장은 독성에 필요하다는 것을 증명한다.







도면1e

|                                    |                                 |     |
|------------------------------------|---------------------------------|-----|
| 주요부분                               | RLIVTYEVDWKNKTVKVVDKYSDDNKPYKEG |     |
|                                    | -----+-----+-----+              |     |
|                                    | 330 340 350                     |     |
|                                    | -----+-----+-----+              |     |
| LukA (Newman).pro                  | RLIVTYEVDWKNKTVKVVDKYSDDNKPYKEG | 351 |
| HMPREF0772_0044(TCH60).pro         | RFIVVYEVDWKNKTVKVVEKYSQNKPYKEG  | 351 |
| HMPREF0774_2356(TCH130).pro        | RLIVTYEVDWKNKTVKVVDKYSDDNKPYKEG | 350 |
| HMPREF0776_0173(USA300_TCH959).pro | RLIVTYEVDWKNKTVKVVDKYTD-NKSFREG | 350 |
| MW1942(MW2).pro                    | RLIVTYEVDWKNKTVKVVDKYSDDNKPYKEG | 350 |
| SA1813(N315).pro                   | RLIVTYEVDWKNKTVKVVDKYSDDNKPYKEG | 351 |
| SAB1876c(RF122).pro                | RLIVTYEVDWKNKTVKVVDKYSDDNKPYKEG | 351 |
| SACOL2006(Col).pro                 | RLIVTYEVDWKNKTVKVVDKYSDDNKPYKEG | 351 |
| SALG_02329(A9635).pro              | RFIVVYEVDWKNKTVKVVEKYSQNKPYKEG  | 351 |
| SAPIG2061(ST398).pro               | RLIVTYEVDWKNKTVKVIDKYSDDNKPYKEG | 351 |
| SAR2108(MRSA252).pro               | RFIVVYEVDWKNKTVKVVEKYSQNKPYKEG  | 351 |
| SATG_01930(D139).pro               | RLIVTYEVDWKNKTVKVIDKYSDDNKPYKEG | 351 |
| SAV2005(Mu50).pro                  | RLIVTYEVDWKNKTVKVVDKYSDDNKPYKEG | 351 |

도면2a

|                    |   |    |
|--------------------|---|----|
| 주요부분               | MIKQLCKNITICSLALSTALTVFPASSYAEIKVSEKSLDGDTRMYTRTATSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKE      |    |
|                    | -----+-----+-----+-----+-----+-----+  |    |
|                    | 10 20 30 40 50 60 70 80   |    |
|                    | -----+-----+-----+-----+-----+-----+  |    |
| A9635.pro          | MIKQVCKNITICSLALSTALTVFPASSYAEIKSKIITVSEKSLDGDTRMYTRTATSDTEKKISQSLQFNFLTEPNYDKE | 80 |
| COL.pro            | -----MYTRTATSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKE  | 32 |
| D139.pro           | MIKQVCKNITICSLALSTALTVFPASSYAEIKVSEKSLDGDTRMYTRTATSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKE      | 80 |
| E1410.pro          | MIKQVCKNITICSLALSTALTVFPASSYAEIKSKIITVSEKSLDGDTRMYTRTATSDTEKKISQSLQFNFLTEPNYDKE | 80 |
| JKD6008.pro        | MIKQLCKNITICTLALSTFTVLPATSFYAKINSEIKVSEKSLDGDTRMYTRTATSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKE  | 80 |
| MRSA252.pro        | MIKQVCKNITICSLALSTALTVFPASSYAEIKSKIITVSEKSLDGDTRMYTRTATSDTEKKISQSLQFNFLTEPNYDKE | 80 |
| Mu50.pro           | MIKQLYKNITICSLALSTALTVFPASSYAEIKVSEKSLDGDTRMYTRTATSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKE      | 80 |
| MW2.pro            | MIKQLYKNITICTLALSTFTVLPATSFYAKINSEIKVSEKSLDGDTRMYTRTATSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKE  | 80 |
| RF122.pro          | MIKQLYKNITICSLTISTALTVFPASSYAEIKVSEKSLDGDTRMYTRTATSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKE      | 80 |
| TCH130.pro         | MIKQLCKNITICTLALSTFTVLPATSFYAKINSEIKVSEKSLDGDTRMYTRTATSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKE  | 80 |
| USA300_FPR3757.pro | MIKQLCKNITICTLALSTFTVLPATSFYAKINSEIKVSEKSLDGDTRMYTRTATSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKE  | 80 |
| Newman (LukB).pro  | MIKQLCKNITICTLALSTFTVLPATSFYAKINSEIKVSEKSLDGDTRMYTRTATSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKE  | 80 |



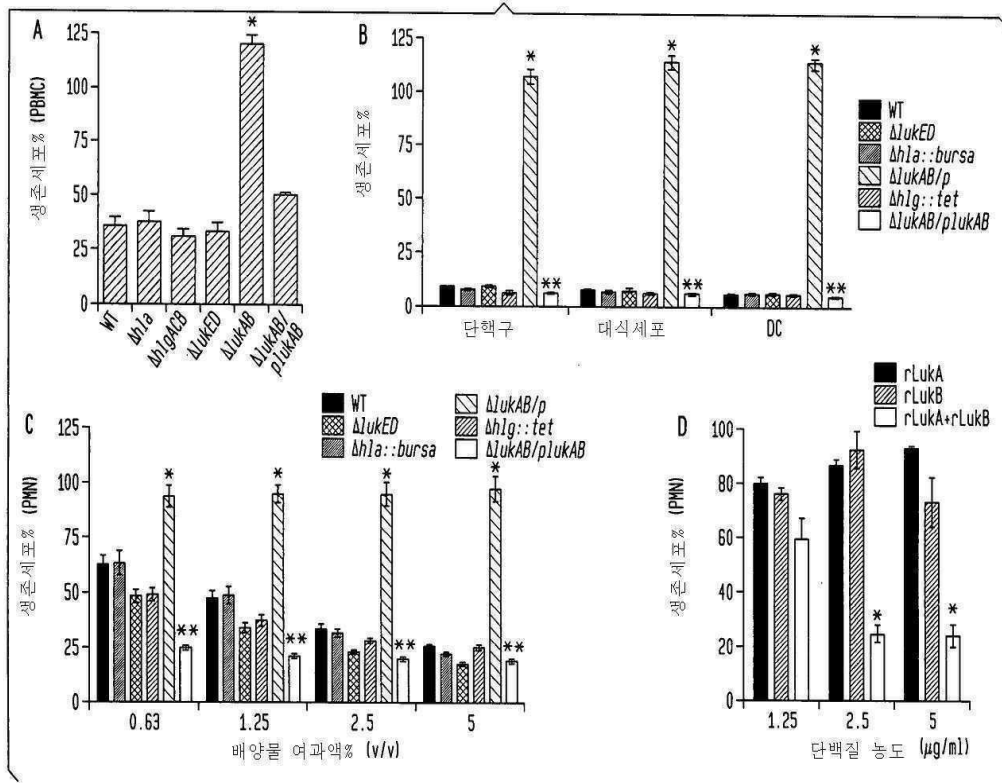
도면2d

| 주요부분               | DNFTPKNKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDKKDKGKSKFVVHYKRSMDFKIDWNRHGFWGYWSENGHVDKKEEKSALYEV |     |
|--------------------|--|-----|
|                    | -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----                                |     |
|                    | 250 260 270 280 290 300 310 320  |     |
|                    | -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----                                |     |
| A9635.pro          | DNFTPKNKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDKKDKGKSRFIVHYKRSMDFKLDWNKHGFWGYWSENGHVDQKEEKSALYEV | 320 |
| COL.pro            | DNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDKKDKGKSKFVVHYKRSMDFKIDWNRHGFWGYWSENGHVDKKEEKSALYEV | 271 |
| D139.pro           | DNFTPKNKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDKKDKGKSKFVVHYKRSMDFKIDWNRHGFWGYWSENGHVDKKEEKSALYEV | 319 |
| E1410.pro          | DNFTPKNKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDKKDKGKSRFIVHYKRSMDFKLDWNKHGFWGYWSENGHVDQKEEKSALYEV | 320 |
| JKD6008.pro        | DNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDKKDKGKSKFVVHYKRSMDFKIDWNRHGFWGYWSENGHVDEKEEKSALYEV | 319 |
| MRSA252.pro        | DNFTPKNKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDKKDKGKSRFIVHYKRSMDFKLDWNKHGFWGYWSENGHVDQKEEKSALYEV | 320 |
| Mu50.pro           | DNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDKKDKGKSKFVVHYKRSMDFKIDWNRHGFWGYWSENGHVDKKEEKSALYEV | 319 |
| MW2.pro            | DNFTPKNKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDKKDKGKSKFVVHYKRSMDFKIDWNRHGFWGYWSENGHVDKKEEKSALYEV | 319 |
| RF122.pro          | DNFTPKNKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDKKDKGKSKFVVHYKRSMDFKIDWNRHGFWGYWSENGHVDKKEEKSALYEV | 319 |
| TCH130.pro         | DNFTPKNKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDKKDKGKSKFVVHYKRSMDFKIDWNRHGFWGYWSENGHVDKKEEKSALYEV | 319 |
| USA300_FPR3757.pro | DNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDKKDKGKSKFVVHYKRSMDFKIDWNRHGFWGYWSENGHVDKKEEKSALYEV | 319 |
| Newman (LukB).pro  | DNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDKKDKGKSKFVVHYKRSMDFKIDWNRHGFWGYWSENGHVDKKEEKSALYEV | 319 |

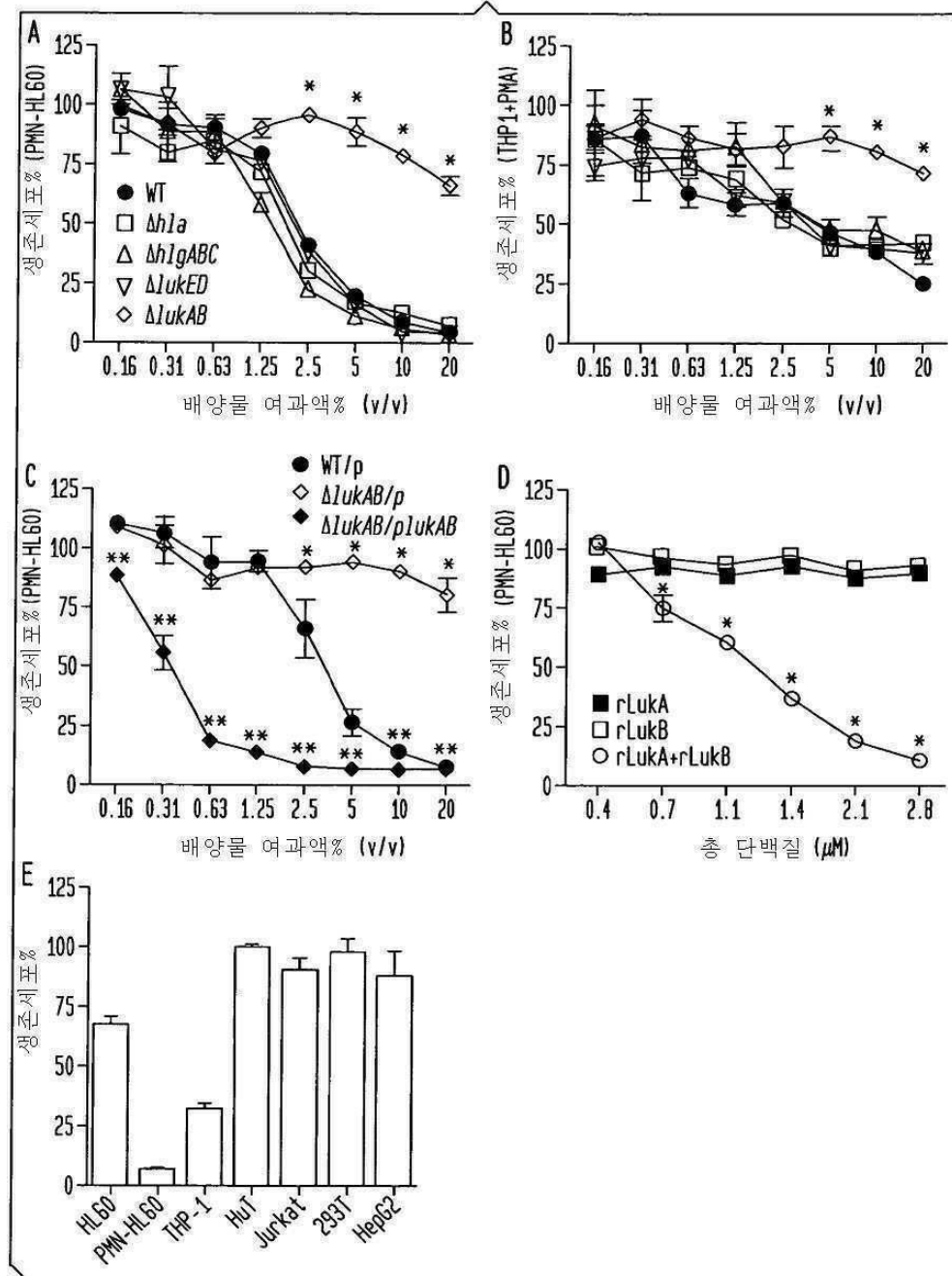
도면2e

| 주요부분               | DWKTHNVKFVKVLDNEKK  |     |
|--------------------|---------------------|-----|
|                    | -----+-----         |     |
|                    | 330                 |     |
|                    | -----+-----         |     |
| A9635.pro          | DWKTHDVKLIKTFNDKEEK | 339 |
| COL.pro            | DWKTHNVKFVKVLDNEKK  | 290 |
| D139.pro           | DWKTHNVKFKVLDNEKEK  | 338 |
| E1410.pro          | DWKTHDVKLIKINDKEQK  | 339 |
| JKD6008.pro        | DWKTHNVKFVKVLDNEKK  | 338 |
| MRSA252.pro        | DWKTHDVKLIKINDKEQK  | 339 |
| Mu50.pro           | DWKTHDVKFVKVLDNEKK  | 338 |
| MW2.pro            | DWKTHNVKFVKVLDNEKK  | 338 |
| RF122.pro          | DWKTHDVKFVKVLDNEKK  | 338 |
| TCH130.pro         | DWKTHNVKFVKVLDNEKK  | 338 |
| USA300_FPR3757.pro | DWKTHNVKFVKVLDNEKK  | 338 |
| Newman (LukB).pro  | DWKTHNVKFVKVLDNEKK  |     |

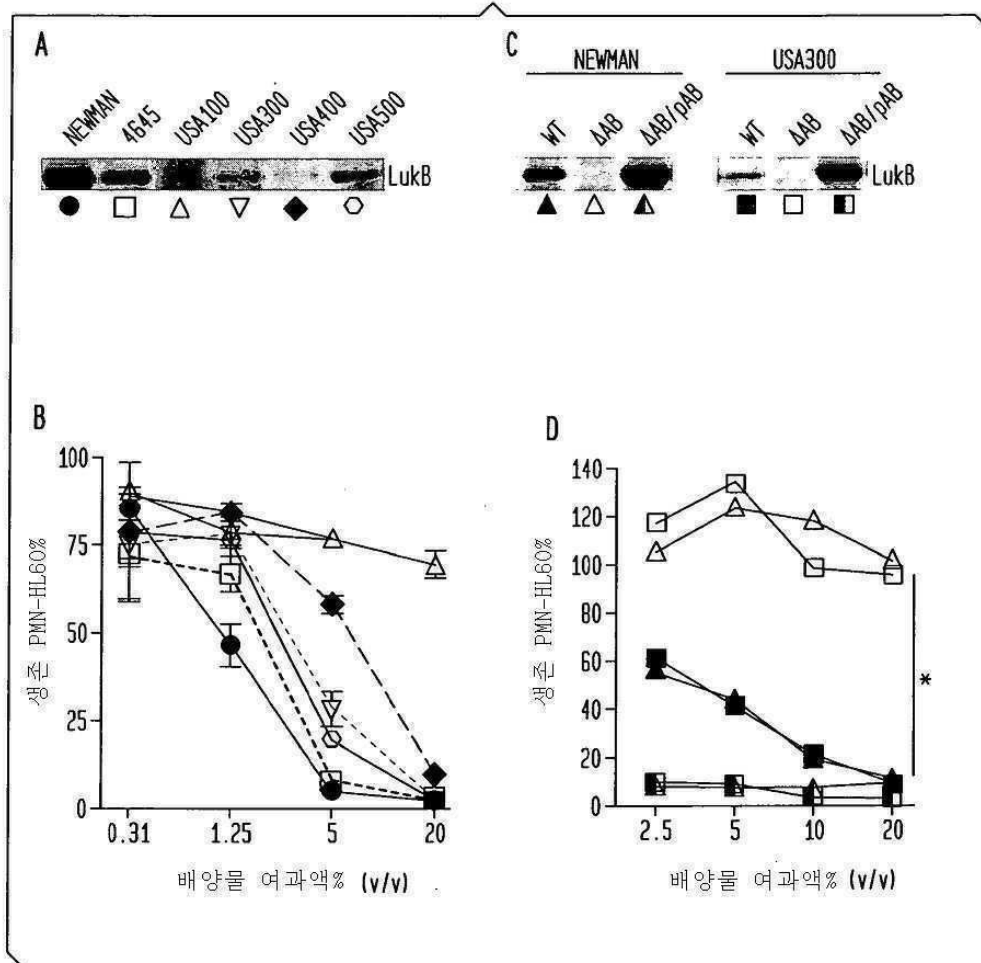
도면3



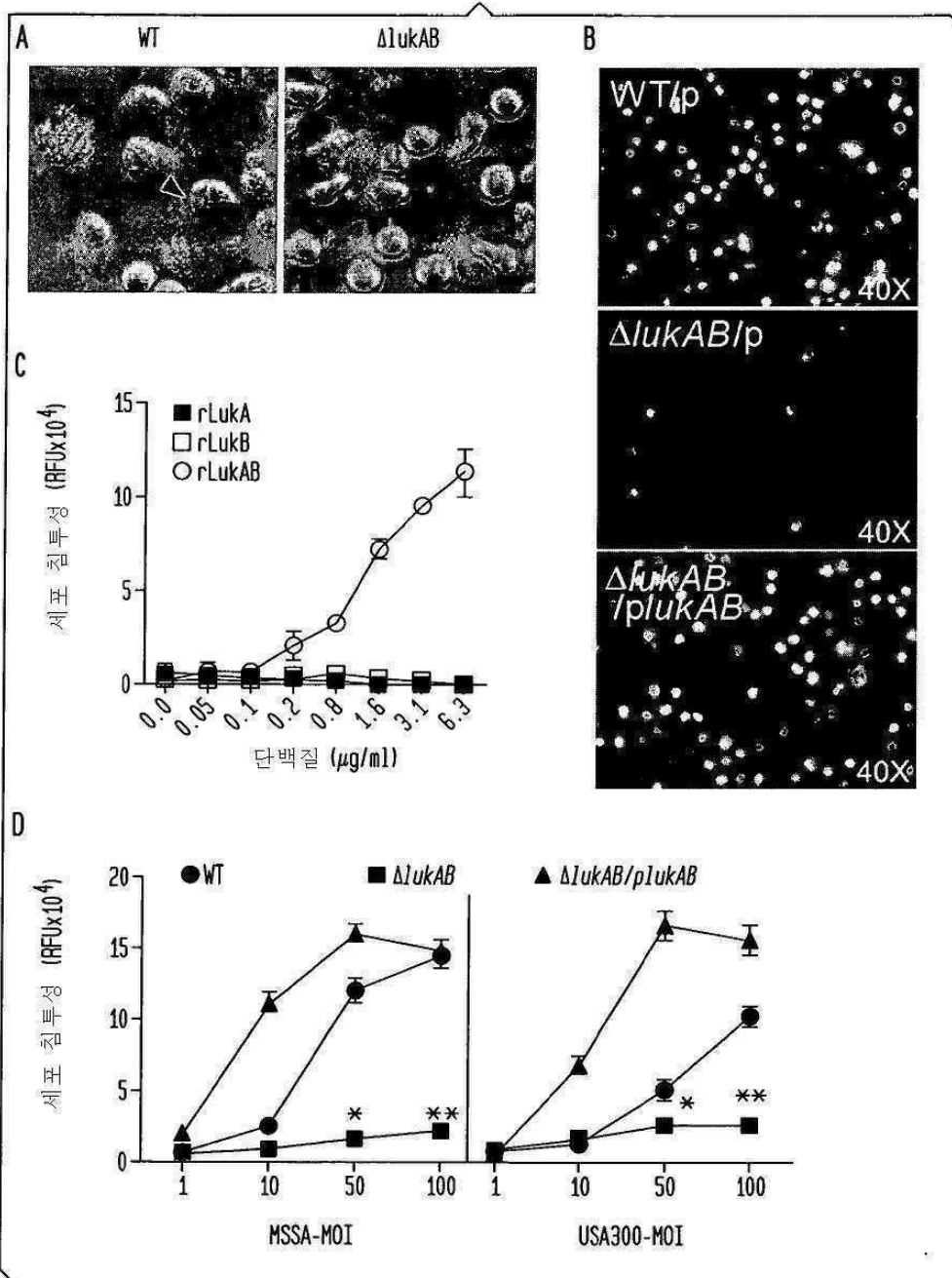
도면4



도면5

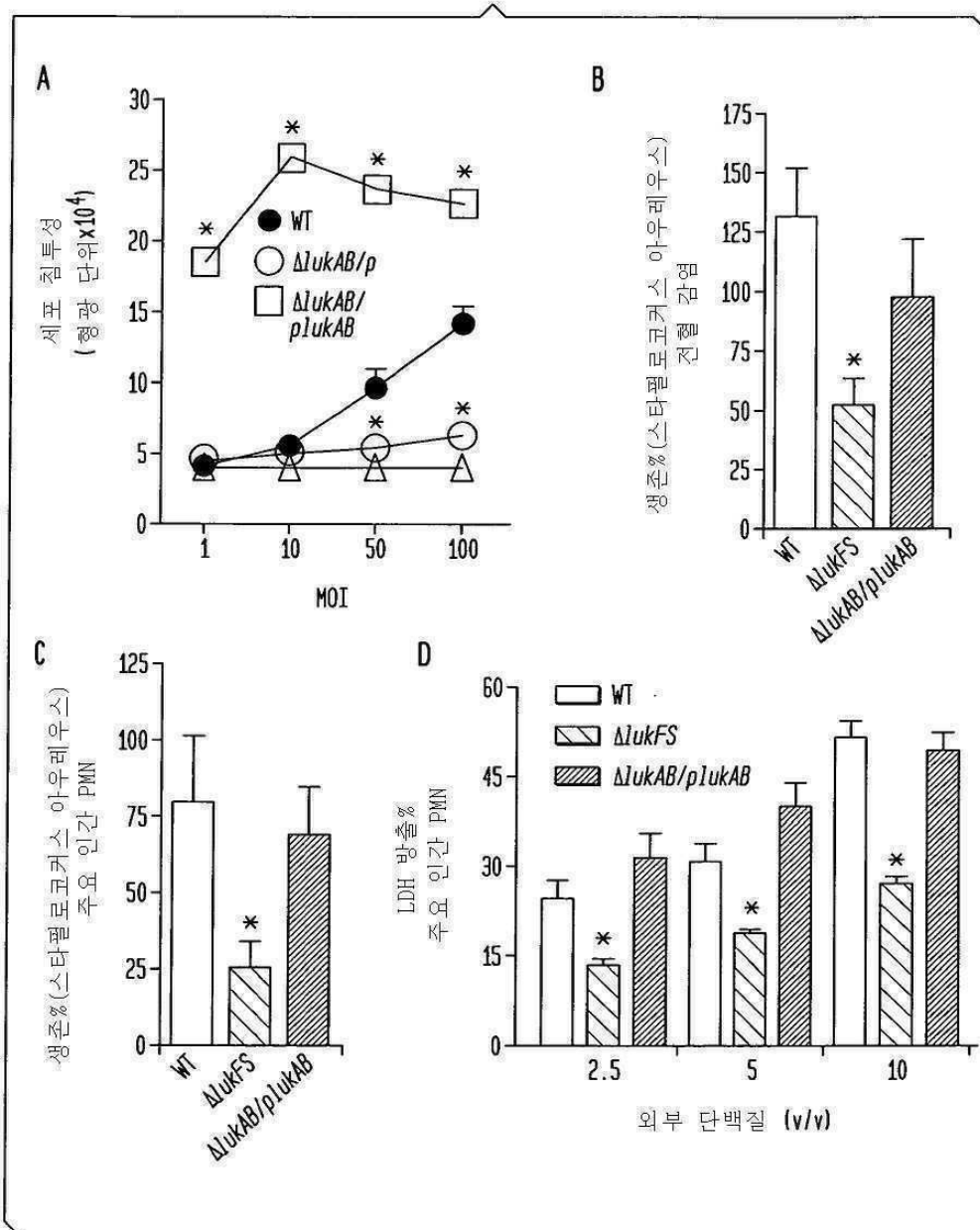


도면6

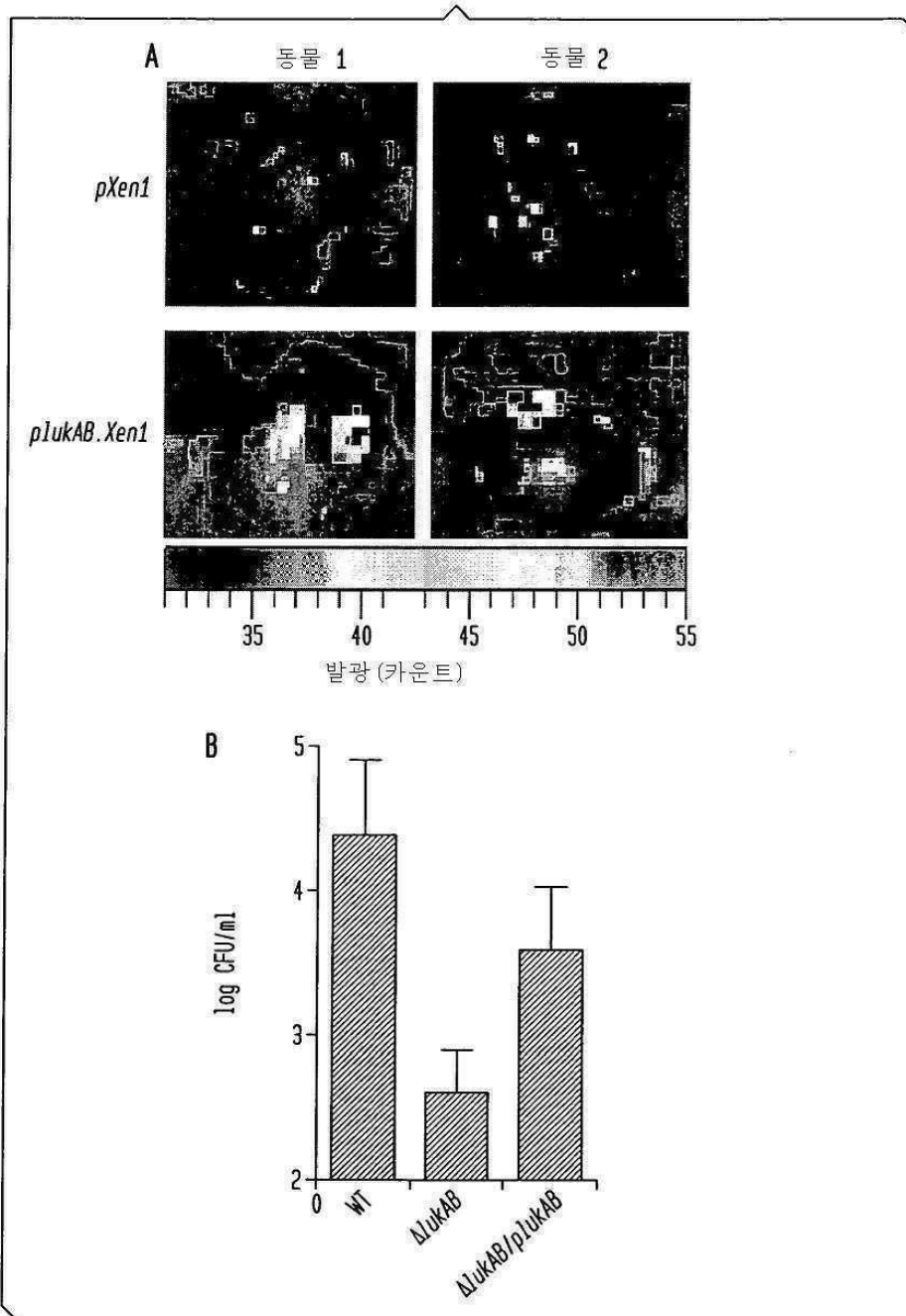




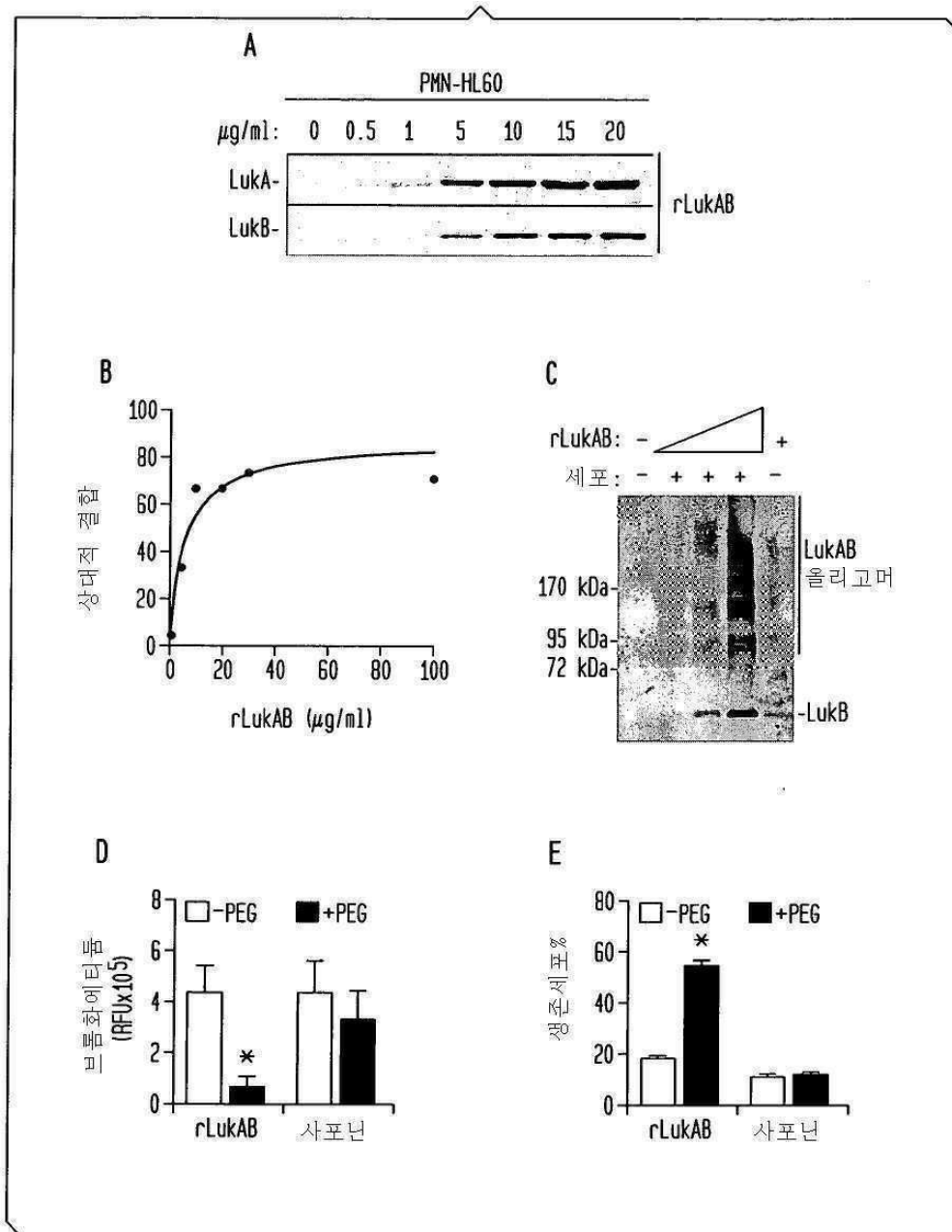
도면7



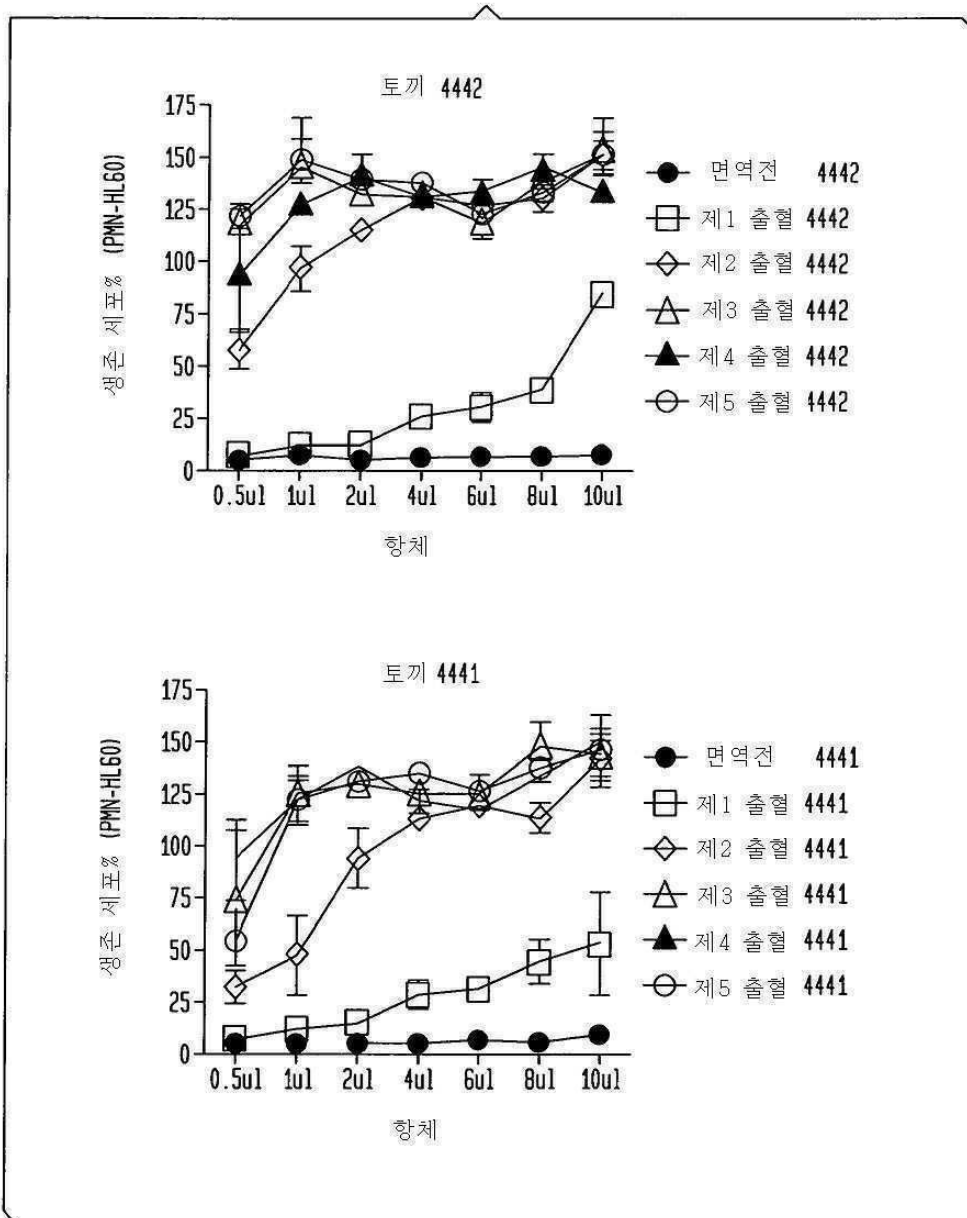
도면8



도면9



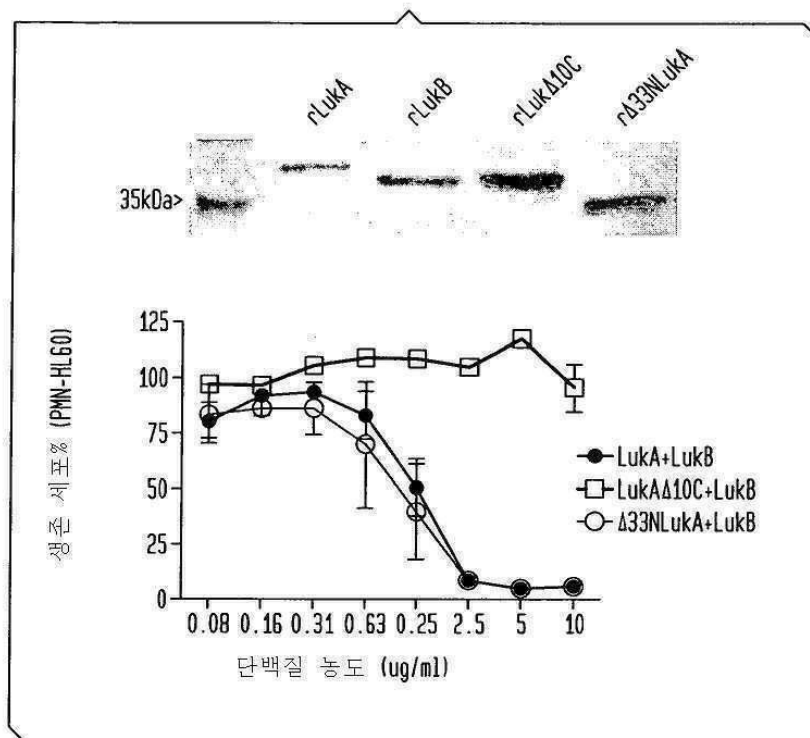
도면10



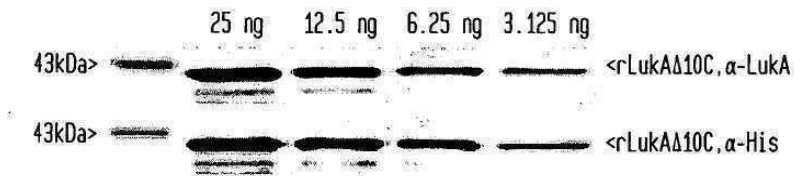
도면11a

|          |   |     |
|----------|---|-----|
| 주요부분     | XNNI EDI GXG - - AEI I KRTEVXSkkWgVtQNI QDFVkdKkYnKDA   |     |
|          | 10 20 30 40 50 60 70 80   |     |
| HlgA     | ENKI EDI GQG - - AEI I KRTQDI TSKRLAI IQNI QDFVkdKkYnKDA  | 45  |
| HlgC     | ANDTEI GkGSDI EI I KRTEdKTSnkWgVtQNI QDFVkdKkYnKDA  | 47  |
| LukE     | NTNI ENI GDG - - AEVI KRTEdVSSkkWgVtQnVQDFVkdKkYnKDA  | 45  |
| LukA     | NSAHKDSQDQNKKEHVdKSQqKdKRNvTNkDKNSTAPDDI GKN - - GKI TKRTETVYDEKtNI LQNL QDFDI DDPTyDKNV          | 78  |
| LukS-PVL | DNNI ENI GDG - - AEVVKRTEdTSsDKWgVtQNI QDFVkdKkYnKDA  | 45  |
| 주요부분     | LI VKMQGF I XSRTTYXYKk - - XXHI KXMXWPFQYNI GLKTK - DPNVXLI NYLPKNI XSXXVSQTLGYNI GGNFQSAPS       |     |
|          | 90 100 110 120 130 140 150 160  |     |
| HlgA     | LVVKMQGF I SSRTTYSdLkK - - YPYI KRMI WPFQYNI SLRTK - DSNVDLI NYLPKNI DSADVSQkLYNI GGNFQSAPS       | 122 |
| HlgC     | LI LkMQGF I SSRTTYNYKk - - TNHVkAMRWPFQYNI GLKtN - dKYVSLI NYLPKNI ESTNVSQTLGYNI GGNFQSAPS        | 124 |
| LukE     | LI VKMQGF I NSRTSFSDVKGSGYELTKRMI WPFQYNI GLTTK - DPNVSLI NYLPKNI ETTDVGQTLGYNI GGNFQSAPS         | 124 |
| LukA     | LLVKKQGS I HSNLkFESHkE - - EKSNWlKYpSEYHVDfQVQRNRkTEI LQlPKNI STAKVDSTfSYSSGGkFDSTKkG             | 156 |
| LukS-PVL | LI LkMQGF I NSkTTYNYKk - - TDHI kAMRWPFQYNI GLKtN - DPNVDLI NYLPKNI DSVNVSQTLGYNI GGNFNSGpS       | 122 |
| 주요부분     | IGGNsFNYSkTI SYNQqNYVSEVE - kQNSkSVkWGvKANSfVTPXGkKSAHDXYL fVXXkPXXP - - NpRDYfVPDNXLP            |     |
|          | 170 180 190 200 210 220 230 240   |     |
| HlgA     | IGGSsFNYSkTI SYNQkNYVTEVE - SQNSkGVkWGvKANSfVTPNGQVSAYDQYLfAQ - DPTGP - - AARDYfVPDNQlP           | 198 |
| HlgC     | LGGNSFNYSkSI SYTQqNYVSEVE - QQNSkSVlWGvKANSfATESGQKSfDSDl fVGyKpHSk - - DpRDYfVPDSELp             | 201 |
| LukE     | IGGNsFNYSkTI SYTQkSYVSEVD - kQNSkSVkWGvKANEfVTPDgkKSAHDryL fVQ - SPNGPTGSAREYfAPDNQlP             | 202 |
| LukA     | I GRTSSNSYSkTI SYNQqNYDTI ASGkNNVHVHWSVI ANDL KYGGEVKNRNdELL fYRNTRI ATVENPELSfASKYRYp            | 236 |
| LukS-PVL | TGGNSFNYSkTI SYNQqNYI SEVE - RQNSkSVQWGI KANSfI TSLGkMSGHDPNL fVGyKpYSQ - - NpRDYfVPDNELp         | 199 |
| 주요부분     | PLVQSGFNpSfI TtLSHEKGSXDTSEfEI TYGRNMDXTXATXR - XHY - - - - LXGXRKHNAfVNRNYTVKYEVNWKtHEI k        |     |
|          | 250 260 270 280 290 300 310 320   |     |
| HlgA     | PLI QSGFNpSfI TtLSHERGkGDKSEfEI TYGRNMDATYAYVI - RHR - - - - LAVDRKHDAfKkNRNVTVKYEVNWKtHEVk       | 273 |
| HlgC     | PLVQSGFNpSfI ATVSHEKGSsDTSEfEI TYGRNMDVTHAI KRSTHYGNSYLdGHRVHNafVNRNYTVKYEVNWKtHEI k              | 281 |
| LukE     | PLVQSGFNpSfI TtLSHEKGSsDTSEfEI SYGRNLDI TYATLfPRTG - - - - I YAERKHNAfVNRNFVVRyEVNWKtHEI k        | 278 |
| LukA     | ALVRSGFNPEFLTYLSNEK - SNEKTQfEVTYTRNQDI LKNRPG - I HY - - - - APPI LEkNKDGGQR - LI VTYEVDWkNKtVVK | 309 |
| LukS-PVL | PLVHSGFNpSfI ATVSHEKGSgDTSEfEI TYGRNMDVTHATRRtTHYGNsYLEGSRI HNAfVNRNYTVKYEVNWKtHEI k              | 279 |
| 주요부분     | VKGHN - - - - -   |     |
|          | 330   |     |
| HlgA     | I KST I PK  | 280 |
| HlgC     | VKGQN   | 286 |
| LukE     | VKGHN   | 283 |
| LukA     | VVDKYsDDNKPYKEG   | 324 |
| LukS-PVL | VKGHN   | 284 |

도면11b



도면11c



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Torres, Victor J.

Dumont, Ashley L.

<120> STAPHYLOCOCCUS AUREUS LEUKOCIDINS, THERAPEUTIC COMPOSITIONS, AND

USES THEREOF

<130> NYU 3.0-001 and NYU 3.4-001

<140> to be assigned

<141> to be assigned

<150> US 61/331,550

<151> 2010-05-05

<160> 49

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 351

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (63)..(63)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (342)..(351)

<223> Amino acids corresponding to these residues may be  
lacking/deleted.

<400> 1

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

Ile Leu Leu Leu Ser Ala Ala Thr Thr Gln Ala Asn Ser Ala His Lys  
                  20                    25                    30

Asp Ser Gln Asp Gln Asn Lys Lys Glu His Val Asp Lys Ser Gln Gln  
                  35                    40                    45

Lys Glu Lys Arg Asn Val Thr Asn Lys Asp Lys Asn Ser Thr Xaa Pro  
                  50                    55                    60

Asp Asp Ile Gly Lys Asn Gly Lys Ile Thr Lys Arg Thr Glu Thr Val  
65                    70                    75                    80

Tyr Asp Glu Lys Thr Asn Ile Leu Gln Asn Leu Gln Phe Asp Phe Ile  
                  85                    90                    95

Asp Asp Pro Thr Tyr Asp Lys Asn Val Leu Leu Val Lys Lys Gln Gly  
                  100                    105                    110

Ser Ile His Ser Asn Leu Lys Phe Glu Ser His Lys Glu Glu Lys Asn  
                  115                    120                    125

Ser Asn Trp Leu Lys Tyr Pro Ser Glu Tyr His Val Asp Phe Gln Val  
                  130                    135                    140

Lys Arg Asn Arg Lys Thr Glu Ile Leu Asp Gln Leu Pro Lys Asn Lys  
 145                      150                      155                      160  
 Ile Ser Thr Ala Lys Val Asp Ser Thr Phe Ser Tyr Ser Ser Gly Gly  
                                  165                      170                      175  
  
 Lys Phe Asp Ser Thr Lys Gly Ile Gly Arg Thr Ser Ser Asn Ser Tyr  
                                  180                      185                      190  
 Ser Lys Thr Ile Ser Tyr Asn Gln Gln Asn Tyr Asp Thr Ile Ala Ser  
                                  195                      200                      205  
 Gly Lys Asn Asn Asn Trp His Val His Trp Ser Val Ile Ala Asn Asp  
                                  210                      215                      220  
 Leu Lys Tyr Gly Gly Glu Val Lys Asn Arg Asn Asp Glu Leu Leu Phe  
 225                      230                      235                      240  
  
 Tyr Arg Asn Thr Arg Ile Ala Thr Val Glu Asn Pro Glu Leu Ser Phe  
                                  245                      250                      255  
 Ala Ser Lys Tyr Arg Tyr Pro Ala Leu Val Arg Ser Gly Phe Asn Pro  
                                  260                      265                      270  
 Glu Phe Leu Thr Tyr Leu Ser Asn Glu Lys Ser Asn Glu Lys Thr Gln  
                                  275                      280                      285  
 Phe Glu Val Thr Tyr Thr Arg Asn Gln Asp Ile Leu Lys Asn Arg Pro  
                                  290                      295                      300  
  
 Gly Ile His Tyr Ala Pro Pro Ile Leu Glu Lys Asn Lys Asp Gly Gln  
 305                      310                      315                      320  
 Arg Leu Ile Val Thr Tyr Glu Val Asp Trp Lys Asn Lys Thr Val Lys  
                                  325                      330                      335  
 Val Val Asp Lys Tyr Ser Asp Asp Asn Lys Pro Tyr Lys Glu Gly  
                                  340                      345                      350  
  
 <210> 2  
 <211> 351  
 <212> PRT  
 <213> Staphylococcus aureus  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (342)..(351)



<223> Amino acids corresponding to these residues may be

lacking/deleted.

<400> 2

Met Lys Asn Lys Lys Arg Val Leu Ile Ala Ser Ser Leu Ser Cys Ala  
 1                    5                    10                    15  
 Ile Leu Leu Leu Ser Ala Ala Thr Thr Gln Ala Asn Ser Ala His Lys  
                   20                    25                    30  
 Asp Ser Gln Asp Gln Asn Lys Lys Glu His Val Asp Lys Ser Gln Gln  
                   35                    40                    45  
 Lys Asp Lys Arg Asn Val Thr Asn Lys Asp Lys Asn Ser Thr Ala Pro  
                   50                    55                    60  
  
 Asp Asp Ile Gly Lys Asn Gly Lys Ile Thr Lys Arg Thr Glu Thr Val  
 65                    70                    75                    80  
 Tyr Asp Glu Lys Thr Asn Ile Leu Gln Asn Leu Gln Phe Asp Phe Ile  
                   85                    90                    95  
 Asp Asp Pro Thr Tyr Asp Lys Asn Val Leu Leu Val Lys Lys Gln Gly  
                   100                    105                    110  
 Ser Ile His Ser Asn Leu Lys Phe Glu Ser His Lys Glu Glu Lys Asn  
                   115                    120                    125  
  
 Ser Asn Trp Leu Lys Tyr Pro Ser Glu Tyr His Val Asp Phe Gln Val  
                   130                    135                    140  
 Lys Arg Asn Arg Lys Thr Glu Ile Leu Asp Gln Leu Pro Lys Asn Lys  
 145                    150                    155                    160  
 Ile Ser Thr Ala Lys Val Asp Ser Thr Phe Ser Tyr Ser Ser Gly Gly  
                   165                    170                    175  
 Lys Phe Asp Ser Thr Lys Gly Ile Gly Arg Thr Ser Ser Asn Ser Tyr  
                   180                    185                    190  
  
 Ser Lys Thr Ile Ser Tyr Asn Gln Gln Asn Tyr Asp Thr Ile Ala Ser  
                   195                    200                    205  
 Gly Lys Asn Asn Asn Trp His Val His Trp Ser Val Ile Ala Asn Asp  
                   210                    215                    220

Leu Lys Tyr Gly Gly Glu Val Lys Asn Arg Asn Asp Glu Leu Leu Phe  
 225                      230                      235                      240

Tyr Arg Asn Thr Arg Ile Ala Thr Val Glu Asn Pro Glu Leu Ser Phe  
                          245                      250                      255

Ala Ser Lys Tyr Arg Tyr Pro Ala Leu Val Arg Ser Gly Phe Asn Pro  
                          260                      265                      270

Glu Phe Leu Thr Tyr Leu Ser Asn Glu Lys Ser Asn Glu Lys Thr Gln  
                          275                      280                      285

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

Gly Ile His Tyr Ala Pro Pro Ile Leu Glu Lys Asn Lys Asp Gly Gln  
 305                      310                      315                      320

Arg Leu Ile Val Thr Tyr Glu Val Asp Trp Lys Asn Lys Thr Val Lys  
                          325                      330                      335

Val Val Asp Lys Tyr Ser Asp Asp Asn Lys Pro Tyr Lys Glu Gly  
                          340                      345                      350

<210> 3

<211> 351

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (342)..(351)

<223> Amino acids corresponding to these residues may be  
 lacking/deleted.

<400> 3

Met Lys Asn Lys Lys Arg Val Phe Ile Ala Ser Ser Leu Ser Cys Ala

1                      5                      10                      15

Leu Leu Leu Leu Ser Ala Ala Asn Thr Glu Ala Asn Ser Ala Asn Lys  
                          20                      25                      30

Asp Ser Gln Asp Gln Thr Lys Lys Glu His Val Asp Lys Ala Gln Gln  
                          35                      40                      45

Lys Glu Lys Arg Asn Val Asn Asp Lys Asp Lys Asn Thr Pro Gly Pro



Gly Ile His Tyr Gly Gln Pro Ile Leu Glu Gln Asn Lys Asp Gly Gln  
 305                      310                      315                      320

Arg Phe Ile Val Val Tyr Glu Val Asp Trp Lys Asn Lys Thr Val Lys

325                      330                      335

Val Val Glu Lys Tyr Ser Asp Gln Asn Lys Pro Tyr Lys Glu Gly

340                      345                      350

<210> 4

<211> 350

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (342)..(350)

<223> Amino acids corresponding to these residues may be  
 lacking/deleted. An additional amino acid was deleted from the  
 C-terminal and is not shown.

<400> 4

Met Lys Asn Lys Lys Arg Val Leu Ile Ala Ser Ser Leu Ser Cys Ala

1                      5                      10                      15

Ile Leu Leu Leu Ser Ala Ala Thr Thr Gln Ala Asn Ser Ala His Lys

20                      25                      30

Asp Ser Gln Asp Gln Asn Lys Lys Glu His Val Asp Lys Ser Gln Gln

35                      40                      45

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

50                      55                      60

Asp Asp Ile Gly Lys Asn Gly Lys Ile Thr Lys Arg Thr Glu Thr Val

65                      70                      75                      80

Tyr Asp Glu Lys Thr Asn Ile Leu Gln Asn Leu Gln Phe Asp Phe Ile

85                      90                      95

Asp Asp Pro Thr Tyr Asp Lys Asn Val Leu Leu Val Lys Lys Gln Gly

100                      105                      110

Ser Ile His Ser Asn Leu Lys Phe Glu Ser His Lys Glu Glu Lys Asn

115                      120                      125

Ser Asn Trp Leu Lys Tyr Pro Ser Glu Tyr His Val Asp Phe Gln Val

130 135 140

Lys Arg Asn Arg Lys Thr Glu Ile Leu Asp Gln Leu Pro Lys Asn Lys

145 150 155 160

Ile Ser Thr Ala Lys Val Asp Ser Thr Phe Ser Tyr Ser Ser Gly Gly

165 170 175

Lys Phe Asp Ser Thr Lys Gly Ile Gly Arg Thr Ser Ser Asn Ser Tyr

180 185 190

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

195 200 205

Gly Lys Asn Asn Asn Trp His Val His Trp Ser Val Ile Ala Asn Asp

210 215 220

Leu Lys Tyr Gly Gly Glu Val Lys Asn Arg Asn Asp Glu Leu Leu Phe

225 230 235 240

Tyr Arg Asn Thr Arg Ile Ala Thr Val Glu Asn Pro Glu Leu Ser Phe

245 250 255

Ala Ser Lys Tyr Arg Tyr Pro Ala Leu Val Arg Ser Gly Phe Asn Pro

260 265 270

Glu Phe Leu Thr Tyr Leu Ser Asn Glu Lys Ser Asn Glu Lys Thr Gln

275 280 285

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

290 295 300

Gly Ile His Tyr Ala Pro Pro Ile Leu Glu Lys Asn Lys Glu Gly Gln

305 310 315 320

Arg Leu Ile Val Thr Tyr Glu Val Asp Trp Lys Asn Lys Thr Val Lys

325 330 335

Val Val Asp Lys Tyr Ser Asp Asn Lys Ser Phe Arg Glu Gly

340 345 350

<210> 5

<211> 350

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (342)..(350)

<223> Amino acids corresponding to these residues may be lacking/deleted. An additional amino acid was deleted from the C-terminal and is not shown.

<400> 5

Met Lys Asn Lys Lys Arg Val Leu Ile Ala Ser Ser Leu Ser Cys Ala

1                    5                    10                    15

Ile Leu Leu Leu Ser Ala Ala Thr Thr Gln Ala Asn Ser Ala His Lys

20                    25                    30

Asp Ser Gln Asp Gln Asn Lys Lys Glu His Val Asp Lys Ser Gln Gln

35                    40                    45

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

50                    55                    60

Asp Asp Ile Gly Lys Asn Gly Lys Ile Thr Lys Arg Thr Glu Thr Val

65                    70                    75                    80

Tyr Asp Glu Lys Thr Asn Ile Leu Gln Asn Leu Gln Phe Asp Phe Ile

85                    90                    95

Asp Asp Pro Thr Tyr Asp Lys Asn Val Leu Leu Val Lys Lys Gln Gly

100                    105                    110

Ser Ile His Ser Asn Leu Lys Phe Glu Ser His Lys Glu Glu Lys Asn

115                    120                    125

Ser Asn Trp Leu Lys Tyr Pro Ser Glu Tyr His Val Asp Phe Gln Val

130                    135                    140

Lys Arg Asn Pro Lys Thr Glu Ile Leu Asp Gln Leu Pro Lys Asn Lys

145                    150                    155                    160

Ile Ser Thr Ala Lys Val Asp Ser Thr Phe Ser Tyr Ser Ser Gly Gly

165                    170                    175

Lys Phe Asp Ser Thr Lys Gly Ile Gly Arg Thr Ser Ser Asn Ser Tyr

180                    185                    190

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

195 200 205

Gly Lys Asn Asn Asn Trp His Val His Trp Ser Val Ile Ala Asn Asp

210 215 220

Leu Lys Tyr Gly Gly Glu Val Lys Asn Arg Asn Asp Glu Leu Leu Phe

225 230 235 240

Tyr Arg Asn Thr Arg Ile Ala Thr Val Glu Asn Pro Glu Leu Ser Phe

245 250 255

Ala Ser Lys Tyr Arg Tyr Pro Ala Leu Val Arg Ser Gly Phe Asn Pro

260 265 270

Glu Phe Leu Thr Tyr Leu Ser Asn Glu Lys Ser Asn Glu Lys Thr Gln

275 280 285

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

290 295 300

Gly Ile His Tyr Ala Pro Pro Ile Leu Glu Lys Asn Lys Glu Gly Gln

305 310 315 320

Arg Leu Ile Val Thr Tyr Glu Val Asp Trp Lys Asn Lys Thr Val Lys

325 330 335

Val Val Asp Lys Tyr Thr Asp Asn Lys Ser Phe Arg Glu Gly

340 345 350

<210> 6

<211> 350

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (342)..(350)

<223> Amino acids corresponding to these residues may be lacking/deleted. An additional amino acid was deleted from the C-terminal and is not shown.

<400> 6

Met Lys Asn Lys Lys Arg Val Leu Ile Ala Ser Ser Leu Ser Cys Ala

1                    5                    10                    15  
 Ile Leu Leu Leu Ser Ala Ala Thr Thr Gln Ala Asn Ser Ala His Lys  
                          20                    25                    30  
 Asp Ser Gln Asp Gln Asn Lys Lys Glu His Val Asp Lys Ser Gln Gln  
                          35                    40                    45  
 Lys Glu Lys Arg Asn Val Thr Asn Lys Asp Lys Asn Ser Thr Val Pro  
                          50                    55                    60  
 Asp Asp Ile Gly Lys Asn Gly Lys Ile Thr Lys Arg Thr Glu Thr Val  
  
 65                    70                    75                    80  
 Tyr Asp Glu Lys Thr Asn Ile Leu Gln Asn Leu Gln Phe Asp Phe Ile  
                          85                    90                    95  
 Asp Asp Pro Thr Tyr Asp Lys Asn Val Leu Leu Val Lys Lys Gln Gly  
                          100                    105                    110  
 Ser Ile His Ser Asn Leu Lys Phe Glu Ser His Lys Glu Glu Lys Asn  
                          115                    120                    125  
 Ser Asn Trp Leu Lys Tyr Pro Ser Glu Tyr His Val Asp Phe Gln Val  
  
 130                    135                    140  
 Lys Arg Asn Pro Lys Thr Glu Ile Leu Asp Gln Leu Pro Lys Asn Lys  
 145                    150                    155                    160  
 Ile Ser Thr Ala Lys Val Asp Ser Thr Phe Ser Tyr Ser Ser Gly Gly  
                          165                    170                    175  
 Lys Phe Asp Ser Thr Lys Gly Ile Gly Arg Thr Ser Ser Asn Ser Tyr  
                          180                    185                    190  
 Ser Lys Thr Ile Ser Tyr Asn Gln Gln Asn Tyr Asp Thr Ile Ala Ser  
  
 195                    200                    205  
 Gly Lys Asn Asn Asn Trp His Val His Trp Ser Val Ile Ala Asn Asp  
                          210                    215                    220  
 Leu Lys Tyr Gly Gly Glu Val Lys Asn Arg Asn Asp Glu Leu Leu Phe  
 225                    230                    235                    240  
 Tyr Arg Asn Thr Arg Ile Ala Thr Val Glu Asn Pro Glu Leu Ser Phe  
                          245                    250                    255



Ala Ser Lys Tyr Arg Tyr Pro Ala Leu Val Arg Ser Gly Phe Asn Pro

260 265 270

Glu Phe Leu Thr Tyr Leu Ser Asn Glu Lys Ser Asn Glu Lys Thr Gln

275 280 285

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

290 295 300

Gly Ile His Tyr Ala Pro Pro Ile Leu Glu Lys Asn Lys Glu Gly Gln

305 310 315 320

Arg Leu Ile Val Thr Tyr Glu Val Asp Trp Lys Asn Lys Thr Val Lys

325 330 335

Val Val Asp Lys Tyr Ser Asp Asn Lys Ser Phe Arg Glu Gly

340 345 350

<210> 7

<211> 351

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (342)..(351)

<223> Amino acids corresponding to these residues may be  
lacking/deleted.

<400> 7

Met Lys Asn Lys Lys Arg Val Leu Ile Ala Ser Ser Leu Ser Cys Ala

1 5 10 15

Ile Leu Leu Leu Ser Ala Ala Thr Thr Gln Ala Asn Ser Ala His Lys

20 25 30

Asp Ser Gln Asp Gln Asn Lys Lys Glu His Val Asp Lys Ser Gln Gln

35 40 45

Lys Asp Lys Arg Asn Val Thr Asn Lys Asp Lys Asn Ser Thr Val Pro

50 55 60

Asp Asp Ile Gly Lys Asn Gly Lys Ile Thr Lys Arg Thr Glu Thr Val

65 70 75 80

Tyr Asp Glu Lys Thr Asn Ile Leu Gln Asn Leu Gln Phe Asp Phe Ile  
 85 90 95  
 Asp Asp Pro Thr Tyr Asp Lys Asn Val Leu Leu Val Lys Lys Gln Gly  
 100 105 110  
 Ser Ile His Ser Asn Leu Lys Phe Glu Ser His Lys Glu Glu Lys Asn  
 115 120 125  
 Ser Asn Trp Leu Lys Tyr Pro Ser Glu Tyr His Val Asp Phe Gln Val  
 130 135 140  
  
 Lys Arg Asn Arg Lys Thr Glu Ile Leu Asp Gln Leu Pro Lys Asn Lys  
 145 150 155 160  
 Ile Ser Thr Ala Lys Val Asp Ser Thr Phe Ser Tyr Ser Ser Gly Gly  
 165 170 175  
 Lys Phe Asp Ser Thr Lys Gly Ile Gly Arg Thr Ser Ser Asn Ser Tyr  
 180 185 190  
 Ser Lys Thr Ile Ser Tyr Asn Gln Gln Asn Tyr Asp Thr Ile Ala Ser  
 195 200 205  
  
 Gly Lys Asn Asn Asn Trp His Val His Trp Ser Val Ile Ala Asn Asp  
 210 215 220  
 Leu Lys Tyr Gly Gly Glu Val Lys Asn Arg Asn Asp Glu Leu Leu Phe  
 225 230 235 240  
 Tyr Arg Asn Thr Arg Ile Ala Thr Val Glu Asn Pro Glu Leu Ser Phe  
 245 250 255  
 Ala Ser Lys Tyr Arg Tyr Pro Ala Leu Val Arg Ser Gly Phe Asn Pro  
 260 265 270  
  
 Glu Phe Leu Thr Tyr Leu Ser Asn Glu Lys Ser Asn Glu Lys Thr Gln  
 275 280 285  
 Phe Glu Val Thr Tyr Thr Arg Asn Gln Asp Ile Leu Lys Asn Arg Pro  
 290 295 300  
 Gly Ile His Tyr Ala Pro Pro Ile Leu Glu Lys Asn Lys Asp Gly Gln  
 305 310 315 320  
 Arg Leu Ile Val Thr Tyr Glu Val Asp Trp Lys Asn Lys Thr Val Lys

325 330 335

Val Val Asp Lys Tyr Ser Asp Asp Asn Lys Pro Tyr Lys Glu Gly

340 345 350

<210> 8

<211> 351

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (342)..(351)

<223> Amino acids corresponding to these residues may be  
lacking/deleted.

<400> 8

Met Lys Asn Lys Lys Arg Val Leu Ile Ala Ser Ser Leu Ser Cys Ala

1 5 10 15

Ile Leu Leu Leu Ser Ala Ala Thr Thr Gln Ala Asn Ser Ala His Lys

20 25 30

Asp Ser Gln Asp Gln Asn Lys Lys Glu His Val Asp Lys Ser Gln Gln

35 40 45

Lys Asp Lys Arg Asn Val Thr Asn Lys Asp Lys Asn Ser Thr Val Pro

50 55 60

Asp Asp Ile Gly Lys Asn Gly Lys Ile Thr Lys Arg Thr Glu Thr Val

65 70 75 80

Tyr Asp Glu Lys Thr Asn Ile Leu Gln Asn Leu Gln Phe Asp Phe Ile

85 90 95

Asp Asp Pro Thr Tyr Asp Lys Asn Val Leu Leu Val Lys Lys Gln Gly

100 105 110

Ser Ile His Ser Asn Leu Lys Phe Glu Ser His Lys Glu Glu Lys Asn

115 120 125

Ser Asn Trp Leu Lys Tyr Pro Ser Glu Tyr His Val Asp Phe Gln Val

130 135 140

Lys Arg Asn Arg Lys Thr Glu Ile Leu Asp Gln Leu Pro Lys Asn Lys

145                    150                    155                    160  
 Ile Ser Thr Ala Lys Val Asp Ser Thr Phe Ser Tyr Ser Ser Gly Gly  
                           165                    170                    175  
 Lys Phe Asp Ser Thr Lys Gly Ile Gly Arg Thr Ser Ser Asn Ser Tyr  
                           180                    185                    190  
 Ser Lys Thr Ile Ser Tyr Asn Gln Gln Lys Tyr Asp Thr Ile Ala Ile  
                           195                    200                    205  
 Gly Lys Asn Asn Asn Trp His Val His Trp Ser Val Ile Ala Asn Asp  
  
                           210                    215                    220  
 Leu Lys Tyr Gly Gly Glu Val Lys Asn Arg Asn Asp Glu Leu Leu Phe  
 225                    230                    235                    240  
 Tyr Arg Asn Thr Arg Ile Ala Thr Val Glu Asn Pro Glu Leu Ser Phe  
                           245                    250                    255  
 Ala Ser Lys Tyr Arg Tyr Pro Ala Leu Val Arg Ser Gly Phe Asn Pro  
                           260                    265                    270  
 Glu Phe Leu Thr Tyr Leu Ser Asn Glu Lys Ser Asn Glu Lys Thr Gln  
  
                           275                    280                    285  
 Phe Glu Val Thr Tyr Thr Arg Asn Gln Asp Ile Leu Lys Asn Arg Pro  
                           290                    295                    300  
 Gly Ile His Tyr Ala Pro Pro Ile Leu Glu Lys Asn Lys Asp Gly Gln  
 305                    310                    315                    320  
 Arg Leu Ile Val Thr Tyr Glu Val Asp Trp Lys Asn Lys Thr Val Lys  
                           325                    330                    335  
 Val Val Asp Lys Tyr Ser Asp Asp Asn Lys Pro Tyr Lys Glu Gly  
  
                           340                    345                    350

<210> 9  
 <211> 351  
 <212> PRT  
 <213> Staphylococcus aureus  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (342)..(351)  
 <223> Amino acids corresponding to these residues may be

lacking/deleted.

<400> 9

Met Lys Asn Lys Lys Arg Val Leu Ile Ala Ser Ser Leu Ser Cys Ala

1                    5                    10                    15

Ile Leu Leu Leu Ser Ala Ala Thr Thr Gln Ala Asn Ser Ala His Lys

                  20                    25                    30

Asp Ser Gln Asp Gln Asn Lys Lys Glu His Val Asp Lys Ser Gln Gln

                  35                    40                    45

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

                  50                    55                    60

Asp Asp Ile Gly Lys Asn Gly Lys Ile Thr Lys Arg Thr Glu Thr Val

65                    70                    75                    80

Tyr Asp Glu Lys Thr Asn Ile Leu Gln Asn Leu Gln Phe Asp Phe Ile

                  85                    90                    95

Asp Asp Pro Thr Tyr Asp Lys Asn Val Leu Leu Val Lys Lys Gln Gly

                  100                    105                    110

Ser Ile His Ser Asn Leu Lys Phe Glu Ser His Lys Glu Glu Lys Asn

                  115                    120                    125

Ser Asn Trp Leu Lys Tyr Pro Ser Glu Tyr His Val Asp Phe Gln Val

                  130                    135                    140

Lys Arg Asn Arg Lys Thr Glu Ile Leu Asp Gln Leu Pro Lys Asn Lys

145                    150                    155                    160

Ile Ser Thr Ala Lys Val Asp Ser Thr Phe Ser Tyr Ser Ser Gly Gly

                  165                    170                    175

Lys Phe Asp Ser Thr Lys Gly Ile Gly Arg Thr Ser Ser Asn Ser Tyr

                  180                    185                    190

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

                  195                    200                    205

Gly Lys Asn Asn Asn Trp His Val His Trp Ser Val Ile Ala Asn Asp

                  210                    215                    220

Leu Lys Tyr Gly Gly Glu Val Lys Asn Arg Asn Asp Glu Leu Leu Phe

225                    230                    235                    240  
 Tyr Arg Asn Thr Arg Ile Ala Thr Val Glu Asn Pro Glu Leu Ser Phe  
                          245                    250                    255  
 Ala Ser Lys Tyr Arg Tyr Pro Ala Leu Val Arg Ser Gly Phe Asn Pro  
                          260                    265                    270  
 Glu Phe Leu Thr Tyr Leu Ser Asn Glu Lys Ser Asn Glu Lys Thr Gln  
                          275                    280                    285  
  
 Phe Glu Val Thr Tyr Thr Arg Asn Gln Asp Ile Leu Lys Asn Arg Pro  
                          290                    295                    300  
 Gly Ile His Tyr Ala Pro Pro Ile Leu Glu Lys Asn Lys Asp Gly Gln  
 305                    310                    315                    320  
 Arg Leu Ile Val Thr Tyr Glu Val Asp Trp Lys Asn Lys Thr Val Lys  
                          325                    330                    335  
 Val Val Asp Lys Tyr Ser Asp Asp Asn Lys Pro Tyr Lys Glu Gly  
                          340                    345                    350

<210> 10

<211> 351

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (342)..(351)

<223> Amino acids corresponding to these residues may be  
 lacking/deleted.

<400> 10

Met Lys Asn Lys Lys Arg Val Phe Ile Ala Ser Ser Leu Ser Cys Ala  
 1                    5                    10                    15  
 Leu Leu Leu Leu Ser Ala Ala Asn Thr Glu Ala Asn Ser Ala Asn Lys  
                          20                    25                    30  
 Asp Ser Gln Asp Gln Thr Lys Lys Glu His Val Asp Lys Ala Gln Gln  
  
                          35                    40                    45  
 Lys Glu Lys Arg Asn Val Asn Asp Lys Asp Lys Asn Thr Pro Gly Pro  
                          50                    55                    60



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

                         325                    330                    335  
 Val Val Glu Lys Tyr Ser Asp Gln Asn Lys Pro Tyr Lys Glu Gly  
                          340                    345                    350

<210> 11

<211> 351

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (342)..(351)

<223> Amino acids corresponding to these residues may be  
 lacking/deleted.

<400> 11

Met Lys Asn Lys Lys Arg Val Phe Ile Ala Ser Ser Leu Ser Cys Ala

1                    5                    10                    15

Leu Leu Leu Leu Ser Ala Ala Asn Thr Glu Ala Asn Ser Ala Asn Lys

                         20                    25                    30

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

                         35                    40                    45

Lys Glu Lys Arg Asn Val Asn Asp Lys Asp Lys Asn Thr Pro Gly Pro

50                    55                    60

Asp Asp Ile Gly Lys Asn Gly Lys Val Thr Lys Arg Thr Glu Thr Val

65                    70                    75                    80

Tyr Asp Glu Lys Thr Asn Ile Leu Gln Asn Leu Gln Phe Asp Phe Ile

                         85                    90                    95

Asp Asp Pro Thr Tyr Asp Lys Asn Val Leu Leu Val Lys Lys Gln Gly

                         100                    105                    110

Ser Ile His Ser Asn Leu Lys Phe Glu Ser His Lys Glu Glu Asn Asn

115                    120                    125

Ser Ser Trp Leu Lys Tyr Pro Ser Glu Tyr His Val Asp Phe Gln Val

130                    135                    140



Lys Ser Asn Arg Lys Thr Glu Ile Leu Asp Gln Leu Pro Lys Asn Lys  
 145                      150                      155                      160  
 Ile Ser Thr Ala Lys Val Asp Ser Thr Phe Ser Tyr Asn Ser Gly Gly  
                                  165                      170                      175  
  
 Lys Phe Asp Ser Val Lys Gly Val Gly Arg Thr Ser Ser Asn Ser Tyr  
                                  180                      185                      190  
 Ser Lys Thr Ile Ser Tyr Asn Gln Gln Asn Tyr Asp Thr Ile Ala Ser  
                                  195                      200                      205  
 Gly Lys Asn Asn Asn Trp His Val His Trp Ser Val Val Ala Asn Asp  
                                  210                      215                      220  
 Leu Lys Tyr Gly Gly Glu Val Lys Asn Arg Asn Asp Asp Phe Leu Phe  
 225                      230                      235                      240  
  
 Tyr Arg Asn Thr Arg Leu Ser Thr Val Glu Asn Pro Glu Leu Ser Phe  
                                  245                      250                      255  
 Ala Ser Lys Tyr Arg Tyr Pro Ala Leu Val Arg Ser Gly Phe Asn Pro  
                                  260                      265                      270  
 Glu Phe Leu Thr Tyr Leu Ser Asn Glu Lys Ser Asn Glu Lys Thr Gln  
                                  275                      280                      285  
 Phe Glu Val Thr Tyr Thr Arg Asn Gln Asp Val Leu Lys Asn Lys Pro  
                                  290                      295                      300  
  
 Gly Ile His Tyr Ala Pro Pro Ile Leu Glu Lys Asn Lys Asp Gly Gln  
 305                      310                      315                      320  
 Arg Leu Ile Val Thr Tyr Glu Val Asp Trp Lys Asn Lys Thr Val Lys  
                                  325                      330                      335  
 Val Ile Asp Lys Tyr Ser Asp Glu Asn Lys Pro Tyr Lys Glu Gly  
                                  340                      345                      350  
  
 <210> 12  
 <211> 351  
 <212> PRT  
 <213> Staphylococcus aureus  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (342)..(351)

<223>

Amino acids corresponding to these residues may be  
lacking/deleted.

<400> 12

Met Lys Asn Lys Lys Arg Val Phe Ile Ala Ser Ser Leu Ser Cys Val  
1                   5                   10                   15  
Leu Leu Leu Leu Ser Ala Ala Asn Thr Glu Ala Asn Ser Ala Asn Lys  
                  20                   25                   30  
Asp Ser Gln Asp Gln Thr Lys Lys Glu His Val Asp Lys Ala Gln Gln  
                  35                   40                   45  
Lys Glu Lys Arg Asn Val Asn Asp Lys Asp Lys Asn Thr Pro Gly Pro  
  
                  50                   55                   60  
Asp Asp Ile Gly Lys Asn Gly Lys Val Thr Lys Arg Thr Val Ser Glu  
65                   70                   75                   80  
Tyr Asp Lys Glu Thr Asn Ile Leu Gln Asn Leu Gln Phe Asp Phe Ile  
                  85                   90                   95  
Asp Asp Pro Thr Tyr Asp Lys Asn Val Leu Leu Val Lys Lys Gln Gly  
                  100                   105                   110  
Ser Ile His Ser Asn Leu Lys Phe Glu Ser His Arg Asn Glu Thr Asn  
  
                  115                   120                   125  
Ala Ser Trp Leu Lys Tyr Pro Ser Glu Tyr His Val Asp Phe Gln Val  
                  130                   135                   140  
Gln Arg Asn Pro Lys Thr Glu Ile Leu Asp Gln Leu Pro Lys Asn Lys  
145                   150                   155                   160  
Ile Ser Thr Ala Lys Val Asp Ser Thr Phe Ser Tyr Ser Leu Gly Gly  
                  165                   170                   175  
Lys Phe Asp Ser Thr Lys Gly Ile Gly Arg Thr Ser Ser Asn Ser Tyr  
  
                  180                   185                   190  
Ser Lys Ser Ile Ser Tyr Asn Gln Gln Asn Tyr Asp Thr Ile Ala Ser  
                  195                   200                   205  
Gly Lys Asn Asn Asn Arg His Val His Trp Ser Val Val Ala Asn Asp  
210                   215                   220

Leu Lys Tyr Gly Asn Glu Ile Lys Asn Arg Asn Asp Glu Phe Leu Phe  
 225                    230                    235                    240  
 Tyr Arg Asn Thr Arg Leu Ser Thr Val Glu Asn Pro Glu Leu Ser Phe  
                          245                    250                    255  
 Ala Ser Lys Tyr Arg Tyr Pro Ala Leu Val Arg Ser Gly Phe Asn Pro  
                          260                    265                    270  
 Glu Phe Leu Thr Tyr Ile Ser Asn Glu Lys Ser Asn Glu Lys Thr Arg  
                          275                    280                    285  
 Phe Glu Val Thr Tyr Thr Arg Asn Gln Asp Ile Leu Lys Asn Lys Pro  
                          290                    295                    300  
 Gly Ile His Tyr Gly Gln Pro Ile Leu Glu Gln Asn Lys Asp Gly Gln  
  
 305                    310                    315                    320  
 Arg Phe Ile Val Val Tyr Glu Val Asp Trp Lys Asn Lys Thr Val Lys  
                          325                    330                    335  
 Val Val Glu Lys Tyr Ser Asp Gln Asn Lys Pro Tyr Lys Glu Gly  
                          340                    345                    350  
  
 <210> 13  
 <211> 351  
 <212> PRT  
 <213> Staphylococcus aureus  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (342)..(351)  
 <223> Amino acids corresponding to these residues may be  
                          lacking/deleted.  
  
 <400> 13  
 Met Lys Asn Lys Lys Arg Val Phe Ile Ala Ser Ser Leu Ser Cys Ala  
 1                    5                    10                    15  
 Leu Leu Leu Leu Ser Ala Ala Asn Thr Glu Ala Asn Ser Ala Asn Lys  
                          20                    25                    30  
 Asp Ser Gln Asp Gln Thr Lys Lys Glu His Val Asp Lys Ala Gln Gln  
                          35                    40                    45  
 Lys Glu Lys Arg Asn Val Asn Asp Lys Asp Lys Asn Thr Pro Gly Pro



Gly Ile His Tyr Ala Pro Pro Ile Leu Glu Lys Asn Lys Asp Gly Gln  
 305 310 315 320

Arg Leu Ile Val Thr Tyr Glu Val Asp Trp Lys Asn Lys Thr Val Lys  
 325 330 335

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

<210> 14

<211> 351

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (342)..(351)

<223> Amino acids corresponding to these residues may be  
 lacking/deleted.

<400> 14

Met Lys Asn Lys Lys Arg Val Leu Ile Ala Ser Ser Leu Ser Cys Ala

1 5 10 15

Ile Leu Leu Leu Ser Ala Ala Thr Thr Gln Ala Asn Ser Ala His Lys

20 25 30

Asp Ser Gln Asp Gln Asn Lys Lys Glu His Val Asp Lys Ser Gln Gln

35 40 45

Lys Asp Lys Arg Asn Val Thr Asn Lys Asp Lys Asn Ser Thr Val Pro

50 55 60

Asp Asp Ile Gly Lys Asn Gly Lys Ile Thr Lys Arg Thr Glu Thr Val

65 70 75 80

Tyr Asp Glu Lys Thr Asn Ile Leu Gln Asn Leu Gln Phe Asp Phe Ile

85 90 95

Asp Asp Pro Thr Tyr Asp Lys Asn Val Leu Leu Val Lys Lys Gln Gly

100 105 110

Ser Ile His Ser Asn Leu Lys Phe Glu Ser His Lys Glu Glu Lys Asn

115 120 125

Ser Asn Trp Leu Lys Tyr Pro Ser Glu Tyr His Val Asp Phe Gln Val

130 135 140

Lys Arg Asn Arg Lys Thr Glu Ile Leu Asp Gln Leu Pro Lys Asn Lys

145 150 155 160

Ile Ser Thr Ala Lys Val Asp Ser Thr Phe Ser Tyr Ser Ser Gly Gly

165 170 175

Lys Phe Asp Ser Thr Lys Gly Ile Gly Arg Thr Ser Ser Asn Ser Tyr

180 185 190

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

195 200 205

Gly Lys Asn Asn Asn Trp His Val His Trp Ser Val Ile Ala Asn Asp

210 215 220

Leu Lys Tyr Gly Gly Glu Val Lys Asn Arg Asn Asp Glu Leu Leu Phe

225 230 235 240

Tyr Arg Asn Thr Arg Ile Ala Thr Val Glu Asn Pro Glu Leu Ser Phe

245 250 255

Ala Ser Lys Tyr Arg Tyr Pro Ala Leu Val Arg Ser Gly Phe Asn Pro

260 265 270

Glu Phe Leu Thr Tyr Leu Ser Asn Glu Lys Ser Asn Glu Lys Thr Gln

275 280 285

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

290 295 300

Gly Ile His Tyr Ala Pro Ser Ile Leu Glu Lys Asn Lys Asp Gly Gln

305 310 315 320

Arg Leu Ile Val Thr Tyr Glu Val Asp Trp Lys Asn Lys Thr Val Lys

325 330 335

Val Val Asp Lys Tyr Ser Asp Asp Asn Lys Pro Tyr Lys Glu Gly

340 345 350

<210> 15

<211> 338

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 15

Met Ile Lys Gln Leu Cys Lys Asn Ile Thr Ile Cys Ser Leu Ala Leu

1                    5                    10                    15

Ser Thr Ala Leu Thr Val Phe Pro Ala Thr Ser Tyr Ala Lys Ile Asn

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

Met Tyr Thr Arg Thr Ala Thr Thr Ser Asp Ser Gln Lys Asn Ile Thr

                  50                    55                    60

Gln Ser Leu Gln Phe Asn Phe Leu Thr Glu Pro Asn Tyr Asp Lys Glu

65                    70                    75                    80

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

                  85                    90                    95

Leu Asp Pro Asn Gly Tyr Trp Asn Ser Thr Leu Arg Trp Pro Gly Ser

                  100                    105                    110

Tyr Ser Val Ser Ile Gln Asn Val Asp Asp Asn Asn Asn Thr Asn Val

                  115                    120                    125

Thr Asp Phe Ala Pro Lys Asn Gln Asp Glu Ser Arg Glu Val Lys Tyr

                  130                    135                    140

Thr Tyr Gly Tyr Lys Thr Gly Gly Asp Phe Ser Ile Asn Arg Gly Gly

145                    150                    155                    160

Leu Thr Gly Asn Ile Thr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Glu Thr Ile Ser

                  165                    170                    175

Tyr Gln Gln Pro Ser Tyr Arg Thr Leu Leu Asp Gln Ser Thr Ser His

                  180                    185                    190

Lys Gly Val Gly Trp Lys Val Glu Ala His Leu Ile Asn Asn Met Gly

                  195                    200                    205

His Asp His Thr Arg Gln Leu Thr Asn Asp Ser Asp Asn Arg Thr Lys

                  210                    215                    220

Ser Glu Ile Phe Ser Leu Thr Arg Asn Gly Asn Leu Trp Ala Lys Asp

225                    230                    235                    240  
 Asn Phe Thr Pro Lys Asn Lys Met Pro Val Thr Val Ser Glu Gly Phe  
                          245                    250                    255  
 Asn Pro Glu Phe Leu Ala Val Met Ser His Asp Lys Lys Asp Lys Gly  
                          260                    265                    270  
 Lys Ser Gln Phe Val Val His Tyr Lys Arg Ser Met Asp Glu Phe Lys  
                          275                    280                    285

Ile Asp Trp Asn Arg His Gly Phe Trp Gly Tyr Trp Ser Gly Glu Asn  
                          290                    295                    300  
 His Val Asp Lys Lys Glu Glu Lys Leu Ser Ala Leu Tyr Glu Val Asp  
 305                    310                    315                    320  
 Trp Lys Thr His Asn Val Lys Phe Val Lys Val Leu Asn Asp Asn Glu  
                          325                    330                    335  
 Lys Lys

<210> 16

<211> 339

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 16

Met Ile Lys Gln Val Cys Lys Asn Ile Thr Ile Cys Ser Leu Ala Leu

1                    5                    10                    15  
 Ser Thr Ala Leu Thr Val Phe Pro Ala Ser Ser Tyr Ala Glu Ile Lys  
                          20                    25                    30  
 Ser Lys Ile Thr Thr Val Ser Glu Lys Asn Leu Asp Gly Asp Thr Lys  
                          35                    40                    45  
 Met Tyr Thr Arg Thr Ala Thr Thr Ser Asp Thr Glu Lys Lys Ile Ser  
                          50                    55                    60  
 Gln Ser Leu Gln Phe Asn Phe Leu Thr Glu Pro Asn Tyr Asp Lys Glu

65                    70                    75                    80  
 Thr Val Phe Ile Lys Ala Lys Gly Thr Ile Gly Ser Gly Leu Lys Ile  
                          85                    90                    95



Leu Asn Pro Asn Gly Tyr Trp Asn Ser Thr Leu Arg Trp Pro Gly Ser  
 100 105 110  
 Tyr Ser Val Ser Ile Gln Asn Val Asp Asp Asn Asn Asn Ser Thr Asn  
 115 120 125  
 Val Thr Asp Phe Ala Pro Lys Asn Gln Asp Glu Ser Arg Glu Val Lys  
 130 135 140  
 Tyr Thr Tyr Gly Tyr Lys Thr Gly Gly Asp Phe Ser Ile Asn Arg Gly  
 145 150 155 160  
 Gly Leu Thr Gly Asn Ile Thr Lys Glu Lys Asn Tyr Ser Glu Thr Ile  
 165 170 175  
 Ser Tyr Gln Gln Pro Ser Tyr Arg Thr Leu Ile Asp Gln Pro Thr Thr  
 180 185 190  
 Asn Lys Gly Val Ala Trp Lys Val Glu Ala His Ser Ile Asn Asn Met  
 195 200 205  
 Gly His Asp His Thr Arg Gln Leu Thr Asn Asp Ser Asp Asp Arg Val  
 210 215 220  
 Lys Ser Glu Ile Phe Ser Leu Thr Arg Asn Gly Asn Leu Trp Ala Lys  
 225 230 235 240  
 Asp Asn Phe Thr Pro Lys Asn Lys Met Pro Val Thr Val Ser Glu Gly  
 245 250 255  
 Phe Asn Pro Glu Phe Leu Ala Val Met Ser His Asp Lys Asn Asp Lys  
 260 265 270  
 Gly Lys Ser Arg Phe Ile Val His Tyr Lys Arg Ser Met Asp Asp Phe  
 275 280 285  
 Lys Leu Asp Trp Asn Lys His Gly Phe Trp Gly Tyr Trp Ser Gly Glu  
 290 295 300  
 Asn His Val Asp Gln Lys Glu Glu Lys Leu Ser Ala Leu Tyr Glu Val  
 305 310 315 320  
 Asp Trp Lys Thr His Asp Val Lys Leu Ile Lys Thr Phe Asn Asp Lys  
 325 330 335  
 Glu Lys Lys

<210> 17

<211> 290

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 17

Met Tyr Thr Arg Thr Ala Thr Thr Ser Asp Ser Gln Lys Asn Ile Thr

1                    5                    10                    15

Gln Ser Leu Gln Phe Asn Phe Leu Thr Glu Pro Asn Tyr Asp Lys Glu

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

Leu Asp Pro Asn Gly Tyr Trp Asn Ser Thr Leu Arg Trp Pro Gly Ser

50                    55                    60

Tyr Ser Val Ser Ile Gln Asn Val Asp Asp Asn Asn Asn Thr Asn Val

65                    70                    75                    80

Thr Asp Phe Ala Pro Lys Asn Gln Asp Glu Ser Arg Glu Val Lys Tyr

                  85                    90                    95

Thr Tyr Gly Tyr Lys Thr Gly Gly Asp Phe Ser Ile Asn Arg Gly Gly

                  100                    105                    110

Leu Thr Gly Asn Ile Thr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Glu Thr Ile Ser

115                    120                    125

Tyr Gln Gln Pro Ser Tyr Arg Thr Leu Leu Asp Gln Ser Thr Ser His

130                    135                    140

Lys Gly Val Gly Trp Lys Val Glu Ala His Leu Ile Asn Asn Met Gly

145                    150                    155                    160

His Asp His Thr Arg Gln Leu Thr Asn Asp Ser Asp Asn Arg Thr Lys

                  165                    170                    175

Ser Glu Ile Phe Ser Leu Thr Arg Asn Gly Asn Leu Trp Ala Lys Asp

180                    185                    190

Asn Phe Thr Pro Lys Asp Lys Met Pro Val Thr Val Ser Glu Gly Phe

195                    200                    205

Asn Pro Glu Phe Leu Ala Val Met Ser His Asp Lys Lys Asp Lys Gly  
 210 215 220  
 Lys Ser Gln Phe Val Val His Tyr Lys Arg Ser Met Asp Glu Phe Lys  
 225 230 235 240  
  
 Ile Asp Trp Asn Arg His Gly Phe Trp Gly Tyr Trp Ser Gly Glu Asn  
 245 250 255  
 His Val Asp Lys Lys Glu Glu Lys Leu Ser Ala Leu Tyr Glu Val Asp  
 260 265 270  
 Trp Lys Thr His Asn Val Lys Phe Val Lys Val Leu Asn Asp Asn Glu  
 275 280 285  
 Lys Lys  
 290  
 <210> 18  
 <211> 338  
 <212> PRT  
 <213> Staphylococcus aureus  
 <400> 18  
 Met Ile Lys Gln Val Cys Lys Asn Ile Thr Ile Cys Ser Leu Ala Leu  
  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Ala Leu Thr Ile Phe Pro Ala Ser Ser Tyr Ala Lys Ile Asn  
 20 25 30  
 Ser Glu Ile Lys Gln Val Ser Glu Lys Asn Leu Asp Gly Glu Thr Lys  
 35 40 45  
 Met Tyr Thr Arg Thr Ala Thr Thr Ser Asp Ser Gln Lys Asn Ile Thr  
 50 55 60  
 Gln Ser Leu Gln Phe Asn Phe Leu Thr Glu Lys Asn Tyr Asp Lys Glu  
  
 65 70 75 80  
 Thr Val Phe Ile Lys Ala Lys Gly Thr Ile Gly Ser Gly Leu Arg Ile  
 85 90 95  
 Leu Glu Pro Asn Gly Tyr Trp Asn Ser Thr Leu Arg Trp Pro Gly Ser  
 100 105 110  
 Tyr Ser Val Ser Ile Gln Asn Val Asp Asp Asn Asn Asn Thr Asn Val

115 120 125  
 Thr Asp Phe Ala Pro Lys Asn Gln Asp Glu Ser Arg Glu Val Lys Tyr

130 135 140  
 Thr Tyr Gly Tyr Lys Thr Gly Gly Asp Phe Ser Ile Asn Gln Gly Gly  
 145 150 155 160

Leu Thr Gly Asn Ile Thr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Glu Thr Ile Ser  
 165 170 175

Tyr Gln Gln Pro Ser Tyr Arg Thr Leu Ile Asp Gln Pro Thr Thr Asn  
 180 185 190

Lys Gly Val Ala Trp Lys Val Glu Ala His Leu Ile Asn Asn Met Gly

195 200 205  
 His Asp His Thr Arg Gln Leu Thr Asn Asp Ser Asp Asp Arg Val Lys

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

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

245 250 255  
 Asn Pro Glu Phe Leu Ala Val Met Ser His Asp Lys Lys Asp Glu Gly

260 265 270  
 Lys Ser Lys Phe Val Val His Tyr Lys Arg Ser Met Asp Glu Phe Lys

275 280 285  
 Ile Asp Trp Asn Lys His Gly Phe Trp Gly Tyr Trp Ser Gly Glu Asn

290 295 300  
 His Val Asp Lys Lys Glu Glu Lys Leu Ser Ala Leu Tyr Glu Val Asp

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

325 330 335  
 Lys Lys

<210> 19

<211> 339

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 19

Met Ile Lys Gln Val Cys Lys Asn Ile Thr Ile Cys Ser Leu Ala Leu

1                    5                    10                    15

Ser Thr Ala Leu Thr Val Phe Pro Ala Ser Ser Tyr Ala Glu Ile Lys

20                    25                    30

Ser Lys Ile Thr Thr Val Ser Glu Lys Asn Leu Asp Gly Asp Thr Lys

35                    40                    45

Met Tyr Thr Arg Thr Ala Thr Thr Ser Asp Thr Glu Lys Lys Ile Ser

50                    55                    60

Gln Ser Leu Gln Phe Asn Phe Leu Thr Glu Pro Asn Tyr Asp Lys Glu

65                    70                    75                    80

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

85                    90                    95

Leu Asn Pro Asn Gly Tyr Trp Asn Ser Thr Leu Thr Trp Pro Gly Ser

100                    105                    110

Tyr Ser Val Ser Ile Gln Asn Val Asp Asp Asn Asn Asn Ser Thr Asn

115                    120                    125

Val Thr Asp Phe Ala Pro Lys Asn Gln Asp Glu Ser Arg Glu Val Lys

130                    135                    140

Tyr Thr Tyr Gly Tyr Lys Thr Gly Gly Asp Phe Ser Ile Asn Arg Gly

145                    150                    155                    160

Gly Leu Thr Gly Asn Ile Thr Lys Glu Lys Asn Tyr Ser Glu Thr Ile

165                    170                    175

Ser Tyr Gln Gln Pro Ser Tyr Arg Thr Leu Ile Asp Gln Pro Thr Thr

180                    185                    190

Asn Lys Gly Val Ala Trp Lys Val Glu Ala His Ser Ile Asn Asn Met

195                    200                    205

Gly His Asp His Thr Arg Gln Leu Thr Asn Asp Ser Asp Asp Arg Val

210                    215                    220

Lys Ser Glu Ile Phe Ser Leu Thr Arg Asn Gly Asn Leu Trp Ala Lys

225                      230                      235                      240

Asp Asn Phe Thr Pro Lys Asn Lys Met Pro Val Thr Val Ser Glu Gly

                                 245                      250                      255

Phe Asn Pro Glu Phe Leu Ala Val Met Ser His Asp Lys Asn Asp Lys

                                 260                      265                      270

Gly Lys Ser Arg Phe Ile Val His Tyr Lys Arg Ser Met Asp Asp Phe

                                 275                      280                      285

Lys Leu Asp Trp Asn Lys His Gly Phe Trp Gly Tyr Trp Ser Gly Glu

                                 290                      295                      300

Asn His Val Asp Gln Lys Glu Glu Lys Leu Ser Ala Leu Tyr Glu Val

305                      310                      315                      320

Asp Trp Lys Thr His Asp Val Lys Leu Ile Lys Thr Ile Asn Asp Lys

                                 325                      330                      335

Glu Gln Lys

<210> 20

<211> 338

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 20

Met Ile Lys Gln Leu Cys Lys Asn Ile Thr Ile Cys Thr Leu Ala Leu

1                      5                      10                      15

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

                                 20                      25                      30

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

                                 35                      40                      45

Met Tyr Thr Arg Thr Ala Thr Thr Ser Asp Ser Gln Lys Asn Ile Thr

                                 50                      55                      60

Gln Ser Leu Gln Phe Asn Phe Leu Thr Glu Pro Asn Tyr Asp Lys Glu

65                      70                      75                      80

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



<210> 21

<211> 339

<212

> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 21

Met Ile Lys Gln Val Cys Lys Asn Ile Thr Ile Cys Ser Leu Ala Leu

1                    5                    10                    15

Ser Thr Ala Leu Thr Val Phe Pro Ala Ser Ser Tyr Ala Glu Ile Lys

20                    25                    30

Ser Lys Ile Thr Thr Val Ser Glu Lys Asn Leu Asp Gly Asp Thr Lys

35                    40                    45

Met Tyr Thr Arg Thr Ala Thr Thr Ser Asp Thr Glu Lys Lys Ile Ser

50                    55                    60

Gln Ser Leu Gln Phe Asn Phe Leu Thr Glu Pro Asn Tyr Asp Lys Glu

65                    70                    75                    80

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

85                    90                    95

Leu Asn Pro Asn Gly Tyr Trp Asn Ser Thr Leu Arg Trp Pro Gly Ser

100                    105                    110

Tyr Ser Val Ser Ile Gln Asn Val Asp Asp Asn Asn Asn Ser Thr Asn

115                    120                    125

Val Thr Asp Phe Ala Pro Lys Asn Gln Asp Glu Ser Arg Glu Val Lys

130                    135                    140

Tyr Thr Tyr Gly Tyr Lys Thr Gly Gly Asp Phe Ser Ile Asn Arg Gly

145                    150                    155                    160

Gly Leu Thr Gly Asn Ile Thr Lys Glu Lys Asn Tyr Ser Glu Thr Ile

165                    170                    175

Ser Tyr Gln Gln Pro Ser Tyr Arg Thr Leu Ile Asp Gln Pro Thr Thr

180                    185                    190

Asn Lys Gly Val Ala Trp Lys Val Glu Ala His Ser Ile Asn Asn Met







305                    310                    315                    320  
 Trp Lys Thr His Asp Val Lys Phe Val Lys Val Leu Asn Asp Asn Glu  
                          325                    330                    335

Lys Lys

<210> 23

<211> 338

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 23

Met Ile Lys Gln Leu Tyr Lys Asn Ile Thr Ile Cys Thr Leu Ala Leu

1                    5                    10                    15  
 Ser Thr Thr Phe Thr Val Leu Pro Ala Thr Ser Tyr Ala Lys Ile Asn  
                          20                    25                    30

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

Met Tyr Thr Arg Thr Ala Thr Thr Ser Asp Ser Gln Lys Asn Ile Thr  
                          50                    55                    60

Gln Ser Leu Gln Phe Asn Phe Leu Thr Glu Pro Asn Tyr Asp Lys Glu

65                    70                    75                    80  
 Thr Val Phe Ile Lys Ala Lys Gly Thr Ile Gly Ser Gly Leu Arg Ile  
                          85                    90                    95

Leu Asp Pro Asn Gly Tyr Trp Asn Ser Thr Leu Arg Trp Pro Gly Ser  
                          100                    105                    110

Tyr Ser Val Ser Ile Gln Asn Val Asp Asp Asn Asn Asn Thr Asn Val  
                          115                    120                    125

Thr Asp Phe Ala Pro Lys Asn Gln Asp Glu Ser Arg Glu Val Lys Tyr

130                    135                    140  
 Thr Tyr Gly Tyr Lys Thr Gly Gly Asp Phe Ser Ile Asn Arg Gly Gly  
 145                    150                    155                    160

Leu Thr Gly Asn Ile Thr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Glu Thr Ile Ser  
                          165                    170                    175

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

<210> 24

<211> 338

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 24

Met Ile Lys Gln Leu Tyr Lys Asn Ile Thr Ile Cys Ser Leu Thr Ile  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Ala Leu Thr Val Phe Pro Ala Thr Ser Tyr Ala Lys Ile Asn  
 20 25 30  
 Ser Glu Ile Lys Ala Val Ser Glu Lys Asn Leu Asp Gly Asp Thr Lys



Ile Asp Trp Asn Arg His Gly Phe Trp Gly Tyr Trp Ser Gly Glu Asn  
 290 295 300

His Val Asp Lys Lys Glu Glu Lys Leu Ser Ala Leu Tyr Glu Val Asp  
 305 310 315 320  
 Trp Lys Thr His Asp Val Lys Phe Val Lys Val Leu Asn Asp Asn Glu  
 325 330 335

Lys Lys

<210> 25

<211> 338

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 25

Met Ile Lys Gln Leu Cys Lys Asn Ile Thr Ile Cys Thr Leu Ala Leu  
 1 5 10 15

Ser Thr Thr Phe Thr Val Leu Pro Ala Thr Ser Phe Ala Lys Ile Asn  
 20 25 30

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

Met Tyr Thr Arg Thr Ala Thr Thr Ser Asp Ser Gln Lys Asn Ile Thr  
 50 55 60

Gln Ser Leu Gln Phe Asn Phe Leu Thr Glu Pro Asn Tyr Asp Lys Glu  
 65 70 75 80

Thr Val Phe Ile Lys Ala Lys Gly Thr Ile Gly Ser Gly Leu Arg Ile  
 85 90 95

Leu Asp Pro Asn Gly Tyr Trp Asn Ser Thr Leu Arg Trp Pro Gly Ser  
 100 105 110

Tyr Ser Val Ser Ile Gln Asn Val Asp Asp Asn Asn Asn Thr Asn Val  
 115 120 125

Thr Asp Phe Ala Pro Lys Asn Gln Asp Glu Ser Arg Glu Val Lys Tyr  
 130 135 140

Thr Tyr Gly Tyr Lys Thr Gly Gly Asp Phe Ser Ile Asn Arg Gly Gly

145 150 155 160

Leu Thr Gly Asn Ile Thr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Glu Thr Ile Ser

165 170 175

Tyr Gln Gln Pro Ser Tyr Arg Thr Leu Leu Asp Gln Ser Thr Ser His

180 185 190

Lys Gly Val Gly Trp Lys Val Glu Ala His Leu Ile Asn Asn Met Gly

195 200 205

His Asp His Thr Arg Gln Leu Thr Asn Asp Ser Asp Asn Arg Thr Lys

210 215 220

Ser Glu Ile Phe Ser Leu Thr Arg Asn Gly Asn Leu Trp Ala Lys Asp

225 230 235 240

Asn Phe Thr Pro Lys Asn Lys Met Pro Val Thr Val Ser Glu Gly Phe

245 250 255

Asn Pro Glu Phe Leu Ala Val Met Ser His Asp Lys Lys Asp Glu Gly

260 265 270

Lys Ser Lys Phe Val Val His Tyr Lys Arg Ser Met Asp Glu Phe Lys

275 280 285

Ile Asp Trp Asn Arg His Gly Phe Trp Gly Tyr Trp Ser Gly Glu Asn

290 295 300

His Val Asp Lys Lys Glu Glu Lys Leu Ser Ala Leu Tyr Glu Val Asp

305 310 315 320

Trp Lys Thr His Asn Val Lys Phe Val Lys Val Leu Asn Asp Asn Glu

325 330 335

Lys Lys

<210> 26

<211> 338

<212>

> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 26

Met Ile Lys Gln Leu Cys Lys Asn Ile Thr Ile Cys Thr Leu Ala Leu  
 1                    5                    10                    15  
 Ser Thr Thr Phe Thr Val Leu Pro Ala Thr Ser Phe Ala Lys Ile Asn  
                   20                    25                    30  
 Ser Glu Ile Lys Gln Val Ser Glu Lys Asn Leu Asp Gly Asp Thr Lys  
                   35                    40                    45  
 Met Tyr Thr Arg Thr Ala Thr Thr Ser Asp Ser Gln Lys Asn Ile Thr  
                   50                    55                    60  
 Gln Ser Leu Gln Phe Asn Phe Leu Thr Glu Pro Asn Tyr Asp Lys Glu  
 65                    70                    75                    80  
 Thr Val Phe Ile Lys Ala Lys Gly Thr Ile Gly Ser Gly Leu Arg Ile  
                   85                    90                    95  
 Leu Asp Pro Asn Gly Tyr Trp Asn Ser Thr Leu Arg Trp Pro Gly Ser  
                   100                    105                    110  
 Tyr Ser Val Ser Ile Gln Asn Val Asp Asp Asn Asn Asn Thr Asn Val  
                   115                    120                    125  
 Thr Asp Phe Ala Pro Lys Asn Gln Asp Glu Ser Arg Glu Val Lys Tyr  
                   130                    135                    140  
 Thr Tyr Gly Tyr Lys Thr Gly Gly Asp Phe Ser Ile Asn Arg Gly Gly  
 145                    150                    155                    160  
 Leu Thr Gly Asn Ile Thr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Glu Thr Ile Ser  
                   165                    170                    175  
 Tyr Gln Gln Pro Ser Tyr Arg Thr Leu Leu Asp Gln Ser Thr Ser His  
                   180                    185                    190  
 Lys Gly Val Gly Trp Lys Val Glu Ala His Leu Ile Asn Asn Met Gly  
                   195                    200                    205  
 His Asp His Thr Arg Gln Leu Thr Asn Asp Ser Asp Asn Arg Thr Lys  
                   210                    215                    220  
 Ser Glu Ile Phe Ser Leu Thr Arg Asn Gly Asn Leu Trp Ala Lys Asp  
 225                    230                    235                    240  
 Asn Phe Thr Pro Lys Asp Lys Met Pro Val Thr Val Ser Glu Gly Phe





Tyr Ser Val Ser Ile Gln Asn Val Asp Asp Asn Asn Asn Thr Asn Val  
 115 120 125  
 Thr Asp Phe Ala Pro Lys Asn Gln Asp Glu Ser Arg Glu Val Lys Tyr  
 130 135 140  
 Thr Tyr Gly Tyr Lys Thr Gly Gly Asp Phe Ser Ile Asn Arg Gly Gly  
 145 150 155 160  
  
 Leu Thr Gly Asn Ile Thr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Glu Thr Ile Ser  
 165 170 175  
 Tyr Gln Gln Pro Ser Tyr Arg Thr Leu Leu Asp Gln Ser Thr Ser His  
 180 185 190  
 Lys Gly Val Gly Trp Lys Val Glu Ala His Leu Ile Asn Asn Met Gly  
 195 200 205  
 His Asp His Thr Arg Gln Leu Thr Asn Asp Ser Asp Asn Arg Thr Lys  
 210 215 220  
  
 Ser Glu Ile Phe Ser Leu Thr Arg Asn Gly Asn Leu Trp Ala Lys Asp  
 225 230 235 240  
 Asn Phe Thr Pro Lys Asp Lys Met Pro Val Thr Val Ser Glu Gly Phe  
 245 250 255  
 Asn Pro Glu Phe Leu Ala Val Met Ser His Asp Lys Lys Asp Lys Gly  
 260 265 270  
 Lys Ser Gln Phe Val Val His Tyr Lys Arg Ser Met Asp Glu Phe Lys  
 275 280 285  
  
 Ile Asp Trp Asn Arg His Gly Phe Trp Gly Tyr Trp Ser Gly Glu Asn  
 290 295 300  
 His Val Asp Lys Lys Glu Glu Lys Leu Ser Ala Leu Tyr Glu Val Asp  
 305 310 315 320  
 Trp Lys Thr His Asn Val Lys Phe Val Lys Val Leu Asn Asp Asn Glu  
 325 330 335  
 Lys Lys

<210> 28

<211> 1056

<212> DNA

<213> Staphylococcus aureus

<400> 28

```

atgaaaaata aaaaacgtgt ttaaatagcg tcatcattat catgtgcaat tttattgtta      60

tcagcagcaa cgactcaagc aaattcagct cataaagact ctcaagacca aaataagaaa      120
gaacatgttg ataagtctca acaaaaagac aaacgtaatg ttactaataa agataaaaat      180
tcaacagcac cggatgatat tgggaaaaac ggtaaaatca caaacgaac tgaacagta      240
tatgatgaga aaacaaatat actccaaaat ttacaattcg actttatcga tgatccaact      300
tatgacaaga atgtattact tgttaaaaaa caaggctcaa ttcattcaaa tttaaagttt      360
gaatctcata aagaagaaaa aaattcaaat tggttaaagt atccaagtga gtacatgta      420
gattttcaag taaaagaaaa tcgtaaaact gaaatattag accaattgcc gaaaaataaa      480

atttcaactg caaaagtaga cagtacattt tcatatagct caggtagtaa attcgattca      540
acaaaaggta ttggacgaac ttcatcaaat agctactcca aaacgattag ttataatcag      600
caaaattatg acacaattgc cagcggtaaa aataataact ggcatgtaca ctggtcagtt      660
attgcgaatg acttgaagta tggtaggagaa gtgaaaaata gaaatgatga attattattc      720
tatagaataa cgagaattgc tactgtagaa aacctgaac taagctttgc ttcaaaatat      780
agataccagc cattagtaag aagtggcttt aatccagaat ttttaactta tttatctaat      840
gaaaagtcaa atgagaaaac gcaatttgaa gtaacataca cacgaaatca agatattttg      900

aaaaacagac ctggaataca ttatgcacct ccaattttag aaaaaataa agatggtcaa      960
agattaattg tcaactatga agttgattgg aaaaataaaa cagttaaagt cgttgataaa     1020
tattctgatg acaataaacc ttataaagaa ggataa                                1056

```

<210> 29

<211> 1017

<212> DNA

<213> Staphylococcus aureus

<400> 29

```

atgattaaac aactatgtaa aaatatcaca atttgtacgt tagcactatc gactactttc      60
actgtattac cagctacttc atttgcaaag attaattctg aaatcaaaca agtttctgag      120
aagaatcttg atggtgatac taaaatgtat acacgtacag ctacaacaag tgatagtcaa      180

aaaaatatta ctcaaagctt acaatttaat ttcttaactg aacctaatTA tgataaagaa      240
acagtattta ttaaagcaaa aggtacaatt ggtagtggtt tgagaatTTT agaccCAAT      300

```

ggttattgga atagtacatt aagatggcct ggatcttatt cagtttcaat tcaaaatggt 360  
 gatgacaaca acaatacaaa tgtgactgac ttgacacaa aaaatcagga tgaatcaaga 420  
 gaagttaaat atacgtatgg ttataaaaca ggtggagatt tttcgattaa tcgtggaggc 480  
 ttaactggaa atattacaaa agagagtaat tattcagaga cgattagtta tcaacaacca 540  
 tcatacgtta cattacttga tcaatctacg tcacataaag gtgtaggttg gaaagtagaa 600  
  
 gcacatttga taaataatat gggacatgac catacgagac aattaactaa tgatagtgat 660  
 aatagaacta aaagtgaat tttttcttta acacgaaatg gaaatttatg ggcgaaagat 720  
 aatttcacac ctaaagacaa aatgcctgta actgtgtctg aagggtttaa tccagaattt 780  
 ttagctgtta tgcacatga taaaaagac aaaggtaaat cacaatttgt tgttcattat 840  
 aaaagatcaa tggatgagtt taaaatagat tggaatcgcc atggtttctg ggctattgg 900  
 tctggtgaaa accatgtaga taaaaagaa gaaaaattat cagcattata tgaagttgat 960  
 tggaagacac ataatgtgaa gtttgtaaaa gtacttaatg ataatgaaaa gaaataa 1017

<210> 30

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Primer

<400> 30

cccgtcgact tacccttctt tataaggttt attgtc 36

<210> 31

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Primer

<400> 31

cccgaaggat ttcacatcat catcatcatc acaattcagc tcataaagac tctc 54

<210> 32

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Primer

<400> 32

ccccgaagga tttcacatca tcatcatcat cacaagatta attctgaaat caaacaag 58

<210> 33  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Primer  
 <400> 33

cccgctgact tatttctttt cattatcatt aagtactt 38

<210> 34  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Primer  
 <400> 34

ccccctcgag aattcagctc ataaagactc tcaag 35

<210> 35  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Primer  
 <400> 35

ccccgatcc ttatccttct ttataaggtt tattgtc 37

<210> 36  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Primer  
 <400> 36

ccccgatcc ttaatatatta tcaacgactt taactg 36

<210> 37  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Primer  
 <400> 37  
 ccccctcgag tcaacagcac cggatgatat tg 32  
 <210> 38  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Primer  
 <400> 38  
 ccccctcgag aagattaatt ctgaaatcaa acaag 35  
  
 <210> 39  
 <211> 40  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Primer  
 <400> 39  
 ccccgatcc ttatttcttt tcattatcat taagtacttt 40  
 <210> 40  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Primer  
 <400> 40  
 gggcatatga attcagctca taaagactct caa 33  
 <210> 41  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Primer  
 <400> 41  
 cccgtcgact ccttctttat aaggtttatt gtc 33  
  
 <210> 42  
 <211> 34

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Primer  
 <400> 42  
 gggcatatga agattaattc tgaaatcaaa caag 34

<210> 43  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Primer  
 <400> 43  
 cccgtcgact ttcttttcat tatcattaag tactt 35

<210> 44  
 <211> 279  
 <212> PRT  
 <213> Staphylococcus aureus  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(279)  
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 44  
 Xaa Asn Asn Ile Glu Asp Ile Gly Xaa Gly Ala Glu Ile Ile Lys Arg  
 1                    5                    10                    15  
 Thr Glu Asp Val Xaa Ser Lys Lys Trp Gly Val Thr Gln Asn Ile Gln  
                   20                    25                    30  
 Phe Asp Phe Val Lys Asp Lys Lys Tyr Asn Lys Asp Ala Leu Ile Val  
                   35                    40                    45  
 Lys Met Gln Gly Phe Ile Xaa Ser Arg Thr Thr Tyr Xaa Xaa Tyr Lys  
                   50                    55                    60  
  
 Lys Xaa Xaa His Ile Lys Xaa Met Xaa Trp Pro Phe Gln Tyr Asn Ile  
 65                    70                    75                    80  
 Gly Leu Lys Thr Lys Asp Pro Asn Val Xaa Leu Ile Asn Tyr Leu Pro  
                   85                    90                    95  
 Lys Asn Lys Ile Xaa Ser Xaa Xaa Val Ser Gln Thr Leu Gly Tyr Asn

100 105 110  
 Ile Gly Gly Asn Phe Gln Ser Ala Pro Ser Ile Gly Gly Asn Gly Ser  
 115 120 125

Phe Asn Tyr Ser Lys Thr Ile Ser Tyr Asn Gln Gln Asn Tyr Val Ser  
 130 135 140

Glu Val Glu Lys Gln Asn Ser Lys Ser Val Lys Trp Gly Val Lys Ala  
 145 150 155 160

Asn Ser Phe Val Thr Pro Xaa Gly Xaa Lys Ser Ala His Asp Xaa Tyr  
 165 170 175

Leu Phe Val Xaa Xaa Lys Pro Xaa Xaa Pro Asn Pro Arg Asp Tyr Phe  
 180 185 190

Val Pro Asp Asn Xaa Leu Pro Pro Leu Val Gln Ser Gly Glu Asn Pro  
 195 200 205

Ser Phe Ile Thr Thr Leu Ser His Glu Lys Gly Ser Xaa Asp Thr Ser  
 210 215 220

Glu Phe Glu Ile Thr Tyr Gly Arg Asn Met Asp Xaa Thr Xaa Ala Thr  
 225 230 235 240

Xaa Arg Xaa His Tyr Leu Xaa Gly Xaa Arg Lys His Asn Ala Glu Val  
 245 250 255

Asn Arg Asn Tyr Thr Val Lys Tyr Glu Val Asn Trp Lys Thr His Glu  
 260 265 270

Ile Lys Val Lys Gly His Asn  
 275

<210> 45

<211> 280

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 45

Glu Asn Lys Ile Glu Asp Ile Gly Gln Gly Ala Glu Ile Ile Lys Arg  
 1 5 10 15

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



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

Lys Ile Lys Ser Ile Thr Pro Lys

275 280

<210> 46

<211> 286

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 46

Ala Asn Asp Thr Glu Asp Ile Gly Lys Gly Ser Asp Ile Glu Ile Ile

1 5 10 15

Lys Arg Thr Glu Asp Lys Thr Ser Asn Lys Trp Gly Val Thr Gln Asn

20 25 30

Ile Gln Phe Asp Phe Val Lys Asp Lys Lys Tyr Asn Lys Asp Ala Leu

35 40 45

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

50 55 60

Tyr Lys Lys Thr Asn His Val Lys Ala Met Arg Trp Pro Phe Gln Tyr

65 70 75 80

Asn Ile Gly Leu Lys Thr Asn Asp Lys Tyr Val Ser Leu Ile Asn Tyr

85 90 95

Leu Pro Lys Asn Lys Ile Glu Ser Thr Asn Val Ser Gln Thr Leu Gly

100 105 110

Tyr Asn Ile Gly Gly Asn Phe Gln Ser Ala Pro Ser Leu Gly Gly Asn

115 120 125

Gly Ser Phe Asn Tyr Ser Lys Ser Ile Ser Tyr Thr Gln Gln Asn Tyr

130 135 140

Val Ser Glu Val Glu Gln Gln Asn Ser Lys Ser Val Leu Trp Gly Val

145 150 155 160

Lys Ala Asn Ser Phe Ala Thr Glu Ser Gly Gln Lys Ser Ala Phe Asp

165 170 175

Ser Asp Leu Phe Val Gly Tyr Lys Pro His Ser Lys Asp Pro Arg Asp

180 185 190

Tyr Phe Val Pro Asp Ser Glu Leu Pro Pro Leu Val Gln Ser Gly Phe  
 195 200 205  
 Asn Pro Ser Phe Ile Ala Thr Val Ser His Glu Lys Gly Ser Ser Asp  
 210 215 220  
 Thr Ser Glu Phe Glu Ile Thr Tyr Gly Arg Asn Met Asp Val Thr His  
 225 230 235 240  
 Ala Ile Lys Arg Ser Thr His Tyr Gly Asn Ser Tyr Leu Asp Gly His  
 245 250 255  
  
 Arg Val His Asn Ala Phe Val Asn Arg Asn Tyr Thr Val Lys Tyr Glu  
 260 265 270  
 Val Asn Trp Lys Thr His Glu Ile Lys Val Lys Gly Gln Asn  
 275 280 285  
 <210> 47  
 <211> 283  
 <212> PRT  
 <213> Staphylococcus aureus  
 <400> 47  
 Asn Thr Asn Ile Glu Asn Ile Gly Asp Gly Ala Glu Val Ile Lys Arg  
 1 5 10 15  
 Thr Glu Asp Val Ser Ser Lys Lys Trp Gly Val Thr Gln Asn Val Gln  
 20 25 30  
 Phe Asp Phe Val Lys Asp Lys Lys Tyr Asn Lys Asp Ala Leu Ile Val  
 35 40 45  
 Lys Met Gln Gly Phe Ile Asn Ser Arg Thr Ser Phe Ser Asp Val Lys  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Tyr Glu Leu Thr Lys Arg Met Ile Trp Pro Phe Gln Tyr  
 65 70 75 80  
 Asn Ile Gly Leu Thr Thr Lys Asp Pro Asn Val Ser Leu Ile Asn Tyr  
 85 90 95  
 Leu Pro Lys Asn Lys Ile Glu Thr Thr Asp Val Gly Gln Thr Leu Gly  
 100 105 110  
 Tyr Asn Ile Gly Gly Asn Phe Gln Ser Ala Pro Ser Ile Gly Gly Asn



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

290 295 300  
 Asn Lys Thr Val Lys Val Val Asp Lys Tyr Ser Asp Asp Asn Lys Pro

305 310 315 320  
 Tyr Lys Glu Gly

<210> 49

<211> 284

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 49

Asp Asn Asn Ile Glu Asn Ile Gly Asp Gly Ala Glu Val Val Lys Arg  
 1 5 10 15  
 Thr Glu Asp Thr Ser Ser Asp Lys Val Gly Val Thr Gln Asn Ile Gln  
 20 25 30  
 Phe Asp Phe Val Lys Asp Lys Lys Tyr Asn Lys Asp Ala Leu Ile Leu

35 40 45  
 Lys Met Gln Gly Phe Ile Asn Ser Lys Thr Thr Tyr Tyr Asn Tyr Lys  
 50 55 60  
 Asn Thr Asp His Ile Lys Ala Met Arg Trp Pro Phe Gln Tyr Asn Ile  
 65 70 75 80  
 Gly Leu Lys Thr Asn Asp Pro Asn Val Asp Leu Ile Asn Tyr Leu Pro  
 85 90 95  
 Lys Asn Lys Ile Asp Ser Val Asn Val Ser Gln Thr Leu Gly Tyr Asn

100 105 110  
 Ile Gly Gly Asn Phe Asn Ser Gly Pro Ser Thr Gly Gly Asn Gly Ser  
 115 120 125  
 Phe Asn Tyr Ser Lys Thr Ile Ser Tyr Asn Gln Gln Asn Tyr Ile Ser  
 130 135 140  
 Glu Val Glu Arg Gln Asn Ser Lys Ser Val Gln Trp Gly Ile Lys Ala  
 145 150 155 160  
 Asn Ser Phe Ile Thr Ser Leu Gly Lys Met Ser Gly His Asp Pro Asn

