

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 806 945**

51 Int. Cl.:

A61K 38/43	(2006.01) C07K 16/12	(2006.01)
C07K 19/00	(2006.01)	
C12N 15/62	(2006.01)	
C12N 15/63	(2006.01)	
A61P 31/04	(2006.01)	
A61K 38/48	(2006.01)	
A61K 39/085	(2006.01)	
C07K 14/31	(2006.01)	
C12N 9/52	(2006.01)	
A61K 45/06	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2013** **PCT/US2013/031695**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **31.10.2013** **WO13162746**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2013** **E 13781494 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020** **EP 2844275**

54 Título: **Antígenos de coagulasa estafilocócica y métodos para su uso**

30 Prioridad:

26.04.2012 US 201261638831 P
23.07.2012 US 201261674619 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.02.2021

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF CHICAGO (100.0%)
5801 S. Ellis
Chicago, IL 60673, US

72 Inventor/es:

MCADOW, MOLLY;
DEDENT, ANDREA;
CHENG, ALICE;
EMOLO, CARLA;
MISSIAKAS, DOMINIQUE y
SCHNEEWIND, OLAF

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 806 945 T3

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

DESCRIPCIÓN

Antígenos de coagulasa estafilocócica y métodos para su uso

5 Antecedentes de la invención

I. Campo de la invención

10 La presente invención se refiere, en general, a los campos de inmunología, microbiología y patología. Más en particular, se refiere a usos y composiciones que implican variantes de coagulasa bacteriana, que se pueden utilizar para inducir una respuesta inmunitaria contra las bacterias como se especifica en las reivindicaciones.

II. Antecedentes

15 El número de infecciones adquiridas tanto en la comunidad como en el hospital ha aumentado en los últimos años con el mayor uso de dispositivos intravasculares. Las infecciones hospitalarias (nosocomiales) son una causa importante de morbilidad y mortalidad, más en particular en los Estados Unidos, donde afecta a más de 2 millones de pacientes anualmente. Las infecciones más frecuentes son infecciones del tracto urinario (33 % de las infecciones), seguido de neumonía (15,5 %), infecciones del sitio quirúrgico (14,8 %) e infecciones primarias del torrente sanguíneo (13 %) (Emori y Gaynes, 1993).

20 Los principales patógenos nosocomiales incluyen *Staphylococcus aureus*, estafilococos negativos para coagulasa (principalmente *Staphylococcus epidermidis*), *Enterococcus* spp., *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Aunque estos patógenos provocan aproximadamente el mismo número de infecciones, la gravedad de los trastornos que pueden producir, combinada con la frecuencia de aislados resistentes a antibióticos, equilibran esta clasificación hacia *S. aureus* y *S. epidermidis* como los patógenos nosocomiales más importantes.

25 Los estafilococos pueden provocar una amplia variedad de enfermedades en seres humanos y otros animales a través de la producción de toxinas o la invasión. Las toxinas estafilocócicas también son una causa habitual de intoxicación alimentaria, ya que las bacterias pueden crecer en alimentos almacenados inadecuadamente.

30 *Staphylococcus epidermidis* es un comensal de la piel normal que también es un importante patógeno oportunista responsable de infecciones de dispositivos médicos deteriorados e infecciones en sitios de cirugía. Los dispositivos médicos infectados por *S. epidermidis* incluyen marcapasos cardíacos, derivaciones de líquido cefalorraquídeo, catéteres de diálisis peritoneal ambulatoria continua, dispositivos ortopédicos y válvulas cardíacas protésicas.

35 *Staphylococcus aureus* es la causa más común de infecciones nosocomiales con una morbilidad y mortalidad significativas. Es la causa de algunos casos de osteomielitis, endocarditis, artritis séptica, neumonía, abscesos y síndrome de choque tóxico. *S. aureus* puede sobrevivir en superficies secas, aumentando la probabilidad de transmisión. Cualquier infección por *S. aureus* puede provocar la dermatitis exfoliativa estafilocócica, una reacción cutánea a la exotoxina absorbida en el torrente sanguíneo. También puede provocar un tipo de septicemia denominada piemia que puede ser potencialmente mortal. Un aspecto problemático es que el *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) se ha convertido en una causa importante de infecciones adquiridas en el hospital.

40 Las infecciones por *S. aureus* y *S. epidermidis* normalmente se tratan con antibióticos, siendo la penicilina el fármaco de preferencia, mientras que se usa vancomicina para aislados resistentes a la meticilina. El porcentaje de cepas estafilocócicas que presentan resistencia de amplio espectro a antibióticos se ha vuelto cada vez más frecuente, representando una amenaza para la terapia antimicrobiana eficaz. Además, la reciente aparición de cepa de *S. aureus* resistente a la vancomicina, ha despertado el temor de que estén surgiendo y propagándose cepas de SARM para las que no hay terapia eficaz disponible.

45 Se está investigando una alternativa al tratamiento con antibióticos para infecciones estafilocócicas que utiliza anticuerpos dirigidos contra antígenos estafilocócicos. Esta terapia implica la administración de antisueros policlonales (documentos WO00/15238, WO00/12132) o tratamiento con anticuerpos monoclonales contra ácido lipoteicoico (documento WO98/57994).

50 Un enfoque alternativo sería el uso de una vacuna activa para generar una respuesta inmunitaria contra estafilococos. Se ha secuenciado el genoma de *S. aureus* y se han identificado muchas de las secuencias codificantes (documentos WO02/094868, EP0786519), lo que puede conducir a la identificación de antígenos potenciales. Lo mismo es cierto para *S. epidermidis* (documento WO01/34809). Como un refinamiento de este enfoque, otros han identificado proteínas que son reconocidas por inmunoseros específicos de pacientes que han padecido infección estafilocócica (documentos WO01/98499, WO02/059148).

55 *S. aureus* secreta una gran cantidad de factores de virulencia en el medio extracelular (Archer, 1998; Dinges *et al.*, 2000; Foster, 2005; Shaw *et al.*, 2004; Sibbald *et al.*, 2006). Como la mayoría de las proteínas secretadas, estos

factores de virulencia son translocados por la maquinaria de Sec a través de la membrana plasmática. Las proteínas secretadas por la maquinaria de Sec portan un péptido líder N-terminal que es eliminado por la peptidasa líder una vez que la preproteína interactúa en el translocón Sec (Dalbey y Wickner, 1985; van Wely *et al.*, 2001). Un análisis reciente del genoma sugiere que las Actinobacterias y los miembros de los Firmicutes, codifican un sistema de secreción adicional que reconoce un subconjunto de proteínas de una manera independiente de Sec (Pallen, 2002). ESAT-6 (diana de antígeno secretado temprano de 6 kDa) y CFP-10 (antígeno filtrado de cultivo de 10 kDa) de *Mycobacterium tuberculosis*, representan los primeros sustratos de este sistema de secreción novedoso denominado ESX-1 o Snm en *M. tuberculosis* (Andersen *et al.*, 1995; Hsu *et al.*, 2003; Pym *et al.*, 2003; Stanley *et al.*, 2003). En *S. aureus*, dos factores de tipo ESAT-6 designados EsxA y EsxB son secretados por la ruta de Ess (sistema de secreción de ESAT-6) (Burts *et al.*, 2005).

La primera generación de vacunas dirigidas contra *S. aureus* o contra las exoproteínas que produce han tenido un éxito limitado (Lee, 1996).

Cheng *et al.* (2010) desvela la contribución de las coagulasas hacia enfermedad por *Staphylococcus aureus* e inmunidad protectora.

McAdow *et al.* (2011) desvela que la coagulasa (Coa), la proteína de unión al factor de von Willebrand (vWbp) y el factor de agrupamiento (Cfa), fueron necesarios para la aglutinación estafilocócica.

Sigue existiendo la necesidad de desarrollar vacunas eficaces contra infecciones estafilocócicas. También son necesarias composiciones adicionales para tratar infecciones estafilocócicas.

Sumario de la invención

Durante la infección, *Staphylococcus aureus* secreta dos coagulasas, Coa y vWbp, que al asociarse con protrombina y fibrinógeno del hospedador, convierten fibrinógeno soluble en fibrina insoluble, inducen la formación de coágulos de fibrina y permiten el establecimiento de enfermedad estafilocócica. Debido al hecho de que Coa y vWbp son factores importantes para la coagulación y aglutinación estafilocócica, que promueven la patogenia de formación de abscesos por *S. aureus* y bacteriemia letal en ratones. Aquí los inventores demuestran que los anticuerpos dirigidos contra la parte variable de unión a protrombina de las coagulasas confieren inmunidad específica de tipo mediante la neutralización de la actividad de coagulación de *S. aureus* y protegen de la enfermedad estafilocócica. En particular, combinando partes variables de coagulasas de aislados norteamericanos en proteínas híbridas Coa y vWbp, se obtuvo una vacuna subunitaria que proporciona protección contra la exposición con cepas de *S. aureus* de diferentes tipos de coagulasa.

La invención se define por las reivindicaciones y cualquier otro aspecto o realización expuesto en el presente documento que no quede dentro del alcance de las reivindicaciones es únicamente para información. En determinadas realizaciones, se proporciona una composición inmunógena que comprende un dominio 1-2 de coagulasa estafilocócica (p. ej., un dominio 1-2 de una proteína estafilocócica Coa o vWbp) como se especifica en las reivindicaciones.

En una realización, la presente invención se refiere a una composición inmunógena que comprende al menos dos dominios de coagulasa estafilocócica 1-2 diferentes, en donde cada uno de los al menos dos dominios 1-2 es al menos 80 % idéntico en secuencia a un dominio 1-2 de la SEQ ID NO: 33-41 y en donde al menos uno del dominio 1-2 está comprendido en una proteína de coagulasa de longitud inferior a la completa que carece de todo un dominio conector (dominio L), dominio de repetición (dominio R) o dominio de unión a fibrinógeno (dominio Fgb).

Por ejemplo, los dominios 1-2 pueden comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos que sea al menos 80, 85, 90, 95, 98, 99 o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de la TABLA DE SECUENCIAS N.º 1 (SEQ ID NO: 33-37) o de la TABLA DE SECUENCIAS N.º 2 (SEQ ID NO: 38-41). Al menos uno de los dominios de coagulasa estafilocócica 1-2 está comprendido en una proteína de coagulasa de longitud inferior a la completa que carece de todo un dominio conector (dominio L), dominio de repetición (dominio R) o dominio de unión a fibrinógeno (dominio Fgb). Por ejemplo, al menos uno de los dominios 1-2 puede estar comprendido en una proteína Coa de longitud inferior a la completa que carece de todo un segmento de dominio L o R o en una proteína vWbp de longitud menor que la completa que carece de un segmento de dominio L o F). En algunos aspectos, un dominio 1-2 es un segmento de dominio 1-2 en el que se ha eliminado la secuencia señal de secreción.

Según la invención, se proporciona una composición inmunógena que comprende al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes. Por ejemplo, una composición puede comprender al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes de una proteína Coa o vWbp estafilocócica, en donde al menos un dominio 1-2 está comprendido en una proteína de coagulasa de longitud inferior a la completa que carece de todo un dominio conector (dominio L), dominio de repetición (dominio R) o dominio de unión a fibrinógeno (dominio Fgb). La secuencia de los dominios 1-2 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de la TABLA DE SECUENCIAS N.º 1 (SEQ ID NO: 33-37) o de la TABLA DE SECUENCIAS N.º 2 (SEQ ID NO: 38-41). En determinados aspectos, la secuencia de los dominios 1-2

- comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 85, 90, 95, 98, 99 o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de la TABLA DE SECUENCIAS N.º 1 (SEQ ID NO: 33-37) o de la TABLA DE SECUENCIAS N.º 2 (SEQ ID NO: 38-41). Según la invención, al menos uno de los dominios 1-2 está comprendido en una secuencia de proteína de coagulasa de longitud inferior a la completa que carece de todo un dominio conector (dominio L), dominio de repetición (dominio R) o dominio de unión a fibrinógeno (dominio Fgb). En realizaciones particulares, la proteína de coagulasa de longitud completa es una proteína Coa que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 42. En aspectos particulares, la proteína de coagulasa de longitud completa es una proteína vWbp que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 75. Según la invención, al menos uno del dominio 1-2 está comprendido en una proteína de coagulasa de longitud inferior a la completa que carece de todo un dominio conector (dominio L), dominio de repetición (dominio R) o dominio de unión a fibrinógeno (dominio Fgb). En otros aspectos más, otra proteína de Coa de longitud inferior a la completa carece de un segmento de dominio L o R. En otros aspectos más, una proteína vWbp truncada adicional carece de todo un segmento de dominio L o F. El término proteína "truncada" se usa para hacer referencia a una proteína o un polipéptido que no alcanza su longitud completa y, por tanto, carece de uno o más de los restos de aminoácidos que están presentes en una proteína normal. La expresión "truncado en relación con una proteína de coagulasa de longitud completa" se utiliza para hacer referencia a una proteína o un polipéptido que no tiene la longitud completa de una proteína de coagulasa y, por tanto, carece de al menos un resto de aminoácido que está presente en una proteína de coagulasa.
- En determinadas realizaciones, uno de los dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica es de cepa de *S. aureus* Newman, 85/2082, MW2, MSSA476, N315, Mu50, MRSA252, Cowan I, WIS o USA300, o cualquier otra cepa de *S. aureus*. En algunas realizaciones, uno de los dominios 1-2 de coagulasa comprende un dominio 1-2 de vWbp de un *S. aureus* N315 o USA300.
- En algunos aspectos, uno de los dominios 1-2 comprende un dominio 1-2 de Coa al menos 80 % idéntico a una secuencia de aminoácidos de la TABLA DE SECUENCIAS N.º 1 (SEQ ID NO: 33-37) o SEQ ID NO: 41. En aspectos adicionales, uno de los dominios 1-2 comprende un dominio 1-2 de Coa al menos 85, 90, 95, 98, 99 % idéntico a una secuencia de aminoácidos de la TABLA DE SECUENCIAS N.º 1 (SEQ ID NO: 33-37) o SEQ ID NO: 41.
- En otros aspectos, uno de los dominios 1-2 comprende un dominio 1-2 de vWbp al menos 80 % idéntico a una secuencia de la TABLA DE SECUENCIAS N.º 2 (SEQ ID NO: 38-40). En aspectos adicionales, uno de los dominios 1-2 comprende un dominio 1-2 de vWbp al menos 85, 90, 95, 98, 99 % idéntico a una secuencia de la TABLA DE SECUENCIAS N.º 2 (SEQ ID NO: 38-40).
- En determinadas realizaciones, uno de los dominios 1-2 es un dominio 1-2 de Coa, que comprende además un dominio L o R de una proteína Coa estafilocócica.
- En determinadas realizaciones, uno de los dominios 1-2 es un dominio 1-2 de vWbp, que comprende además un dominio L o Fgb de una proteína vWbp estafilocócica.
- En algunos aspectos, una composición inmunógena comprende al menos tres, cuatro o cinco dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes. En aspectos adicionales, una composición inmunógena comprende al menos cuatro dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes. En realizaciones particulares, los al menos cuatro dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes son dominios 1-2 de Coa estafilocócica de las cepas MRSA252, MW2, N315 y USA300.
- En algunas realizaciones, se contempla que una composición inmunógena comprende al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes como se especifica en las reivindicaciones que están comprendidas en una proteína de fusión.
- En realizaciones adicionales, la composición inmunógena comprende además uno o más antígenos estafilocócicos adicionales. En realizaciones adicionales, la composición inmunógena también puede incluir un adyuvante. En realizaciones particulares, el o los antígenos estafilocócicos adicionales son Emp, EsxA, EsxB, EsaC, Eap, Ebh, EsaB, Coa, vWbp, vWh, Hla, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, IsdC, ClfA, ClfB, SasF o un SpA no toxígeno.
- Se desvela un polipéptido recombinante que comprende al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes. Las secuencias de los dominios 1-2 son al menos 80 % idénticas a una secuencia de aminoácidos de la TABLA DE SECUENCIAS N.º 1 (SEQ ID NO: 33-37) o de la TABLA DE SECUENCIAS N.º 2 (SEQ ID NO: 38-41). En algunos aspectos, las secuencias de los dominios 1-2 son al menos 85, 90, 95, 98, 99 % idénticas a una secuencia de aminoácidos de la TABLA DE SECUENCIAS N.º 1 (SEQ ID NO: 33-37) o de la TABLA DE SECUENCIAS N.º 2 (SEQ ID NO: 38-41).
- En otra divulgación, se contempla una molécula polinucleotídica que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido recombinante que comprende una secuencia que codifica al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes. En una divulgación adicional, un vector de expresión comprende la secuencia de ácido nucleico unida operativamente a una secuencia de control de la expresión. En otra divulgación adicional, también se contempla una célula hospedadora que comprende el vector de expresión.

Se desvela el uso de la composición, el polipéptido recombinante, la molécula polinucleotídica y el vector de expresión descritos en el presente documento para tratar o prevenir una infección estafilocócica en un sujeto. La presente invención se refiere a una cantidad eficaz de una composición de la invención para su uso en un método para tratar o prevenir una infección estafilocócica en un sujeto. En algunos aspectos, se usa una composición que comprende al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes para tratar o prevenir una infección estafilocócica. Las secuencias de los dominios 1-2 son al menos 80 % idénticas a una secuencia de aminoácidos de la TABLA DE SECUENCIAS N.º 1 (SEQ ID NO: 33-37) o de la TABLA DE SECUENCIAS N.º 2 (SEQ ID NO: 38-41) y al menos uno de los dominios 1-2 es una secuencia de proteína de coagulasa truncada y carece de todo un dominio conector (dominio L), dominio de repetición (dominio R) o dominio de unión a fibrinógeno (dominio Fgb).

Se describe un método para fabricar una composición inmunógena que comprende mezclar al menos dos polipéptidos 1-2 de dominios de coagulasa estafilocócica diferentes. Las secuencias de los dominios 1-2 son al menos 80 % idénticas a una secuencia de aminoácidos de la TABLA DE SECUENCIAS N.º 1 (SEQ ID NO: 33-37) o de la TABLA DE SECUENCIAS N.º 2 (SEQ ID NO: 38-41) y al menos uno de los dominios 1-2 es una secuencia de proteína de coagulasa truncada.

Las realizaciones incluyen el uso de al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes descritos en el presente documento en composiciones para el tratamiento de infección bacteriana y/o estafilocócica. Asimismo, determinadas realizaciones proporcionan composiciones que se pueden usar para tratar (p. ej., limitando la formación y/o persistencia de abscesos estafilocócicos en un sujeto) o prevenir la infección bacteriana. En algunos casos desvelados, los métodos para estimular una respuesta inmunitaria implican administrar al sujeto una cantidad eficaz de la composición inmunógena descrita en el presente documento y en determinados aspectos, otras proteínas bacterianas. Otras proteínas bacterianas incluyen (i) un factor de virulencia secretado, y/o una proteína o un péptido de superficie celular, o (ii) una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica un factor de virulencia secretado, y/o una proteína o un péptido de superficie celular.

Se ha desvelado que se puede administrar al sujeto la composición inmunógena, el polipéptido recombinante o el vector descrito en el presente documento. El polipéptido recombinante o el vector pueden formularse en una composición farmacéuticamente aceptable. La composición puede comprender además uno o más de al menos o como máximo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19 antígenos estafilocócicos adicionales o fragmentos inmunógenos de los mismos (p. ej., Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla (p. ej., mutantes H35), IsdC, SasF, vWbp o vWh). Los antígenos estafilocócicos adicionales que pueden usarse incluyen proteína de unión a vitronectina de 52 kDa (documento WO 01/60852), Aaa (GenBank CAC80837), Aap (referencia de GenBank AJ249487), Ant (referencia de GenBank NP_372518), autolisina glucosaminidasa, autolisina amidasa, Cna, proteína de unión a colágeno (documento US6288214), EFB (FIB), proteína de unión a elastina (EbpS), EPB, FbpA, proteína de unión a fibrinógeno (documento US6008341), proteína de unión a fibronectina (documento US5840846), FnbA, FnbB, GehD (documento US 2002/0169288), HarA, HBP, transportador ABC inmunodominante, IsaA/PisA, receptor de laminina, lipasa GehD, MAP, transportador de Mg²⁺, análogo de MHC II (documento US5648240), MRPII, Npasa, proteína activadora de ARN III (RAP), SasA, SasB, SasC, SasD, Sask, SBI, SdrF (documento WO 00/12689), SdrG / Fig (documento WO 00/12689), SdrH (documento WO 00/12689), exotoxinas SEA (documento WO 00/02523), exotoxinas SEB (documento WO 00/02523), transportador ABC de SitC y Ni, proteína de unión a SitC/MntC/saliva (documento US5.801.234), SsaA, SSP-1, SSP-2 y/o proteína de unión a Vitronectina (véase publicaciones PCT WO2007/113222, WO2007/113223, WO2006/032472, WO2006/032475, WO2006/032500).

El antígeno estafilocócico o fragmento inmunógeno se puede administrar simultáneamente con la composición inmunógena que comprende al menos dos dominios 1-2 de coagulasa diferentes, el polipéptido recombinante que comprende al menos dos dominios 1-2 diferentes y/o el vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos dos dominios 1-2 diferentes descritos en el presente documento. El antígeno estafilocócico o fragmento inmunógeno se puede administrar en la misma composición con la composición inmunógena que comprende al menos dos dominios 1-2 diferentes, el polipéptido recombinante que comprende al menos dos dominios 1-2 diferentes y/o el vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos dos dominios 1-2 diferentes descritos en el presente documento. Como se usa en el presente documento, el término "modular" o "modulación" abarca los significados de las palabras "mejorar" o "inhibir". La "modulación" de la actividad puede ser un aumento o una disminución de la actividad. Como se usa en el presente documento, el término "modulador" se refiere a compuestos que afectan a la función de un resto, incluyendo regulación positiva, inducción, estimulación, potenciación, inhibición, regulación negativa o supresión de una proteína, ácido nucleico, gen, organismo o similar.

Una molécula de ácido nucleico recombinante puede codificar al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes y al menos un antígeno estafilocócico o fragmento inmunógeno del mismo. En una divulgación en particular, uno de los al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes es un dominio 1-2 de Coa al menos 80 % idéntico a una secuencia de aminoácidos de la TABLA DE SECUENCIAS N.º 1 (SEQ ID NO: 33-37). En otros aspectos más, uno de los al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes es un dominio 1-2 de vWbp al menos 80 % idéntico a una secuencia de la TABLA DE SECUENCIAS N.º 2 (SEQ ID NO:

38-41). En alguna divulgación, la molécula de ácido nucleico recombinante comprende una secuencia que codifica una proteína de coagulasa troncada y la proteína de coagulasa troncada incluye uno de los al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes. En una divulgación en particular, la proteína de coagulasa es una proteína Coa que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 42. En aspectos particulares, la proteína de coagulasa es una proteína vWbp que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 75.

En determinadas realizaciones, la composición o el polipéptido que comprende al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes se puede usar en combinación con factores secretados o antígenos de superficie que incluyen uno o más de un polipéptido Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp o vWh aislado o segmento inmunógeno del mismo. Los antígenos estafilocócicos adicionales que pueden usarse incluyen proteína de unión a vitronectina de 52 kDa (documento WO 01/60852), Aaa, Aap, Ant, autolisina glucosaminidasa, autolisina amidasa, Cna, proteína de unión a colágeno (documento US6288214), EFB (FIB), proteína de unión a elastina (EbpS), EPB, FbpA, proteína de unión a fibrinógeno (documento US6008341), proteína de unión a fibronectina (documento US5840846), FnbA, FnbB, GehD (documento US 2002/0169288), HarA, HBP, transportador ABC inmunodominante, IsaA/PisA, receptor de laminina, lipasa GehD, MAP, transportador de Mg²⁺, análogo de MHC II (documento US5648240), MRPII, Npasa, proteína activadora de ARN III (RAP), SasA, SasB, SasC, SasD, SasK, SBI, SdrF (documento WO 00/12689), SdrG / Fig (documento WO 00/12689), SdrH (documento WO 00/12689), exotoxinas SEA (documento WO 00/02523), exotoxinas SEB (documento WO 00/02523), transportador ABC de SitC y Ni, proteína de unión a SitC/MntC/saliva (documento US5.801.234), SsaA, SSP-1, SSP-2 y/o proteína de unión a vitronectina. En determinadas realizaciones, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp, vWh, proteína de unión a vitronectina de 52 kDa (documento WO 01/60852), Aaa, Aap, Ant, autolisina glucosaminidasa, autolisina amidasa, Cna, proteína de unión a colágeno (documento US6288214), EFB (FIB), proteína de unión a elastina (EbpS), EPB, FbpA, proteína de unión a fibrinógeno (documento US6008341), proteína de unión a fibronectina (documento US5840846), FnbA, FnbB, GehD (documento US 2002/0169288), HarA, HBP, transportador ABC inmunodominante, IsaA/PisA, receptor de laminina, lipasa GehD, MAP, transportador de Mg²⁺, análogo de MHC II (documento US5648240), MRPII, Npasa, proteína activadora de ARN III (RAP), SasA, SasB, SasC, SasD, SasK, SBI, SdrF (documento WO 00/12689), SdrG / Fig (documento WO 00/12689), SdrH (documento WO 00/12689), exotoxinas SEA (documento WO 00/02523), exotoxinas SEB (documento WO 00/02523), transportador ABC de SitC y Ni, proteína de unión a SitC/MntC/saliva (documento US5.801.234), SsaA, SSP-1, SSP-2 y/o proteína de unión a vitronectina, pueden excluirse específicamente de una formulación de la invención.

La siguiente tabla enumera las diversas combinaciones de dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica y diversos antígenos estafilocócicos adicionales:

ES 2 806 945 T3

Tabla 1. Dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica y combinaciones de antígenos estafilocócicos

Eap	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ebh		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Emp			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsaB				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsaC					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsxA						+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsxB							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrC								+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrD									+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrE										+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdA											+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdB												+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ClfA													+	+	+	+	+	+	+	+	+
ClfB														+	+	+	+	+	+	+	+
Coa															+	+	+	+	+	+	+
Hla																+	+	+	+	+	+
Hla _{H35A}																	+	+	+	+	+
IsdC																		+	+	+	+
SasF																			+	+	+
vWbp																				+	+
vWh																					+

Ebh		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-----	--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

ES 2 806 945 T3

Emp			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsaB				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsaC					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsxA						+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsxB							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrC								+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrD									+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrE										+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdA											+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdB												+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ClfA													+	+	+	+	+	+	+	+	+
ClfB														+	+	+	+	+	+	+	+
Coa															+	+	+	+	+	+	+
Hla																+	+	+	+	+	+
Hla _{H35A}																	+	+	+	+	+
IsdC																		+	+	+	+
SasF																			+	+	+
vWbp																				+	+
vWh																					+

Emp			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsaB				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsaC					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsxA						+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

ES 2 806 945 T3

EsxB							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrC								+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrD									+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrE										+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdA											+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdB												+	+	+	+	+	+	+	+	+
ClfA													+	+	+	+	+	+	+	+
ClfB														+	+	+	+	+	+	+
Coa															+	+	+	+	+	+
Hla																+	+	+	+	+
Hla _{H35A}																	+	+	+	+
IsdC																		+	+	+
SasF																			+	+
vWbp																				+
vWh																				+

EsaB				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsaC					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsxA						+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsxB							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrC								+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrD									+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrE										+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdA											+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

IsdB														+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CifA															+	+	+	+	+	+	+	+	+
CifB																+	+	+	+	+	+	+	+
Coa																	+	+	+	+	+	+	+
Hla																		+	+	+	+	+	+
Hla _{H35A}																			+	+	+	+	+
IsdC																				+	+	+	+
SasF																					+	+	+
vWbp																						+	+
vWh																							+

EsaC						+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsxA							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsxB								+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrC									+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrD										+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrE											+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdA												+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdB													+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CifA														+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CifB															+	+	+	+	+	+	+	+	+
Coa																	+	+	+	+	+	+	+
Hla																		+	+	+	+	+	+
Hla _{H35A}																			+	+	+	+	+

IsdC																		+	+	+	+
SasF																			+	+	+
vWbp																				+	+
vWh																					+

EsxA						+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsxB							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrC								+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrD									+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrE										+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdA											+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdB												+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CifA													+	+	+	+	+	+	+	+	+
CifB														+	+	+	+	+	+	+	+
Coa															+	+	+	+	+	+	+
Hla																+	+	+	+	+	+
Hla _{H35A}																	+	+	+	+	+
IsdC																		+	+	+	+
SasF																			+	+	+
vWbp																				+	+
vWh																					+

EsxB								+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrC									+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

SdrD										+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrE											+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdA												+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdB													+	+	+	+	+	+	+	+
CifA														+	+	+	+	+	+	+
CifB															+	+	+	+	+	+
Coa																+	+	+	+	+
Hla																	+	+	+	+
Hla _{H35A}																		+	+	+
IsdC																		+	+	+
SasF																			+	+
vWbp																				+
vWh																				+

SdrC										+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrD											+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrE												+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdA													+	+	+	+	+	+	+	+
IsdB														+	+	+	+	+	+	+
CifA															+	+	+	+	+	+
CifB																+	+	+	+	+
Coa																	+	+	+	+
Hla																		+	+	+
Hla _{H35A}																			+	+

IsdC																		+	+	+	+
SasF																			+	+	+
vWbp																				+	+
vWh																					+

SdrD										+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrE											+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdA												+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdB													+	+	+	+	+	+	+	+	+
CifA														+	+	+	+	+	+	+	+
CifB															+	+	+	+	+	+	+
Coa																+	+	+	+	+	+
Hla																	+	+	+	+	+
Hla _{H35A}																		+	+	+	+
IsdC																			+	+	+
SasF																				+	+
vWbp																					+
vWh																					+

SdrE											+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdA												+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdB													+	+	+	+	+	+	+	+	+
CifA														+	+	+	+	+	+	+	+
CifB															+	+	+	+	+	+	+

Coa																+	+	+	+	+	+	+
Hla																	+	+	+	+	+	+
Hla _{H35A}																		+	+	+	+	+
IsdC																			+	+	+	+
SasF																				+	+	+
vWbp																					+	+
vWh																						+

IsdA												+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdB													+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CifA														+	+	+	+	+	+	+	+	+
CifB															+	+	+	+	+	+	+	+
Coa																+	+	+	+	+	+	+
Hla																	+	+	+	+	+	+
Hla _{H35A}																		+	+	+	+	+
IsdC																			+	+	+	+
SasF																				+	+	+
vWbp																					+	+
vWh																						+

IsdB													+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CifA														+	+	+	+	+	+	+	+	+
CifB															+	+	+	+	+	+	+	+
Coa																+	+	+	+	+	+	+

Hla																		+	+	+	+	+	+
Hla _{H35A}																			+	+	+	+	+
IsdC																				+	+	+	+
SasF																					+	+	+
vWbp																						+	+
vWh																							+

CifA														+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CifB															+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Coa																+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hla																	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hla _{H35A}																		+	+	+	+	+	+	+	+
IsdC																			+	+	+	+	+	+	+
SasF																				+	+	+	+	+	+
vWbp																							+	+	+
vWh																								+	+

CifB																				+	+	+	+	+	+	+	+
Coa																					+	+	+	+	+	+	+
Hla																						+	+	+	+	+	+
Hla _{H35A}																							+	+	+	+	+
IsdC																							+	+	+	+	+
SasF																								+	+	+	+
vWbp																									+	+	+

ES 2 806 945 T3

vWh																					+
-----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---

Coa																+	+	+	+	+	+	+
Hla																	+	+	+	+	+	+
Hla _{H35A}																		+	+	+	+	+
IsdC																			+	+	+	+
SasF																				+	+	+
vWbp																					+	+
vWh																						+

Hla																	+	+	+	+	+	+
Hla _{H35A}																		+	+	+	+	+
IsdC																			+	+	+	+
SasF																				+	+	+
vWbp																					+	+
vWh																						+

Hla _{H35A}																		+	+	+	+	+
IsdC																			+	+	+	+
SasF																				+	+	+
vWbp																					+	+
vWh																						+

IsdC																			+	+	+	+
------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---	---	---	---

[illegible][illegible][illegible][illegible]

En una divulgación, el polipéptido recombinante aislado que comprende al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes descritos en el presente documento está multimerizado, p. ej., dimerizado o es una fusión lineal de dos o más polipéptidos o segmentos peptídicos. En determinados aspectos de la invención, una composición comprende multímeros o concatámeros de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más proteínas de superficie celular aisladas o segmentos de las mismas. Los concatámeros son polipéptidos lineales que tienen una o más unidades peptídicas repetitivas. Los al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes, pueden ser consecutivos o estar separados por un espaciador u otras secuencias peptídicas, p. ej., uno o más péptidos bacterianos adicionales. En un aspecto adicional, los otros polipéptidos o péptidos contenidos en el multímero o concatámero pueden incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 de Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp, vWh o fragmentos inmunógenos de los mismos. Los antígenos estafilocócicos adicionales que se pueden usar en combinación con al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes, incluyen proteína de unión a vitronectina de 52 kDa (documento WO 01/60852), Aaa, Aap, Ant, autolisina glucosaminidasa, autolisina amidasa, Cna, proteína de unión a colágeno (documento US6288214), EFB (FIB), proteína de unión a elastina (EbpS), EPB, FbpA, proteinade unión a fibrinógeno (documento US6008341), proteína de unión a fibronectina (documento US5840846), FnbA, FnbB, GehD (documento US 2002/0169288), HarA, HBP, transportador ABC inmunodominante, IsaA/PisA, receptor de laminina, lipasa GehD, MAP, transportador de Mg²⁺, análogo de MHC II (documento US5648240), MRPII, Npasa, proteína activadora de ARN III (RAP), SasA, SasB, SasC, SasD, SasK, SBI, SdrF (documento WO 00/12689), SdrG / Fig (documento WO 00/12689), SdrH (documento WO 00/12689), exotoxinas SEA (documento WO 00/02523), exotoxinas SEB (documento WO 00/02523), transportador ABC de SitC y Ni, proteína de unión a SitC/MntC/saliva (documento US5.801.234), SsaA, SSP-1, SSP-2 y/o proteína de unión a vitronectina.

Se desvelan métodos para inducir una respuesta inmunitaria contra una bacteria estafilococo o estafilococos en un sujeto, que comprende proporcionar al sujeto una cantidad eficaz de una composición inmunógena o un polipéptido recombinante que comprende al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes o un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que lo codifica. Se desvelan métodos para inducir una respuesta inmunitaria contra una bacteria estafilococo o estafilococos en un sujeto, que comprende proporcionar al sujeto una cantidad eficaz de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o más proteínas secretadas y/o proteínas de la superficie celular o segmentos/fragmentos de las mismas. Una proteína secretada o proteína de la superficie celular incluye proteínas Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp y/o vWh proteínas y fragmentos inmunógenos de las mismas. Los antígenos estafilocócicos adicionales que pueden usarse incluyen proteína de unión a vitronectina de 52 kDa (documento WO 01/60852), Aaa, Aap, Ant, autolisina glucosaminidasa, autolisina amidasa, Cna, proteína de unión a colágeno

(documento US6288214), EFB (FIB), proteína de unión a elastina (EbpS), EPB, FbpA, proteína de unión a fibrinógeno (documento US6008341), proteína de unión a fibronectina (documento US5840846), FnbA, FnbB, GehD (documento US 2002/0169288), HarA, HBP, transportador ABC inmunodominante, IsaA/PisA, receptor de laminina, lipasa GehD, MAP, transportador de Mg²⁺, análogo de MHC II (documento US5648240), MRPII, Npasa, proteína activadora de ARN III (RAP), SasA, SasB, SasC, SasD, SasK, SBI, SdrF (documento WO 00/12689), SdrG / Fig (documento WO 00/12689), SdrH (documento WO 00/12689), exotoxinas SEA (documento WO 00/02523), exotoxinas SEB (documento WO 00/02523), transportador ABC de SitC y Ni, proteína de unión a SitC/MntC/saliva (documento US5.801.234), SsaA, SSP-1, SSP-2 y/o proteína de unión a vitronectina.

Se desvelan composiciones que incluyen un polipéptido, péptido o proteína que comprende una secuencia que es o es al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica o similar a un dominio 1-2 de coagulasa estafilocócica, en particular, un dominio 1-2 de Coa (véase, TABLA DE SECUENCIAS N.º 1 (SEQ ID NO: 33-37) o SEQ ID NO: 41) o un dominio 1-2 de vWbp (véase, TABLA DE SECUENCIAS N.º 2 (SEQ ID NO: 38-40)), o una segunda proteína o péptido que es una proteína bacteriana secretada o una proteína bacteriana de superficie celular. La similitud o identidad, con preferencia de identidad, se conoce en la técnica y se pueden usar varios programas diferentes para identificar si una proteína (o un ácido nucleico) tiene identidad o similitud de secuencia con una secuencia conocida. La identidad y/o similitud de secuencia se determina utilizando técnicas convencionales conocidas en este campo, incluyendo el algoritmo de identidad de secuencia local de Smith y Waterman (1981), mediante el algoritmo de alineación de identidad de secuencia de Needleman y Wunsch (1970), mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete informático Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.), el programa de secuencia Best Fit descrito por Devereux *et al.* (1984), utilizando preferentemente la configuración predeterminada o mediante inspección. Preferentemente, el porcentaje de identidad se calcula mediante el uso de herramientas de alineación conocidas y fácilmente comprobables por los expertos en la materia. El porcentaje de identidad es esencialmente el número de aminoácidos idénticos dividido por el número total de aminoácidos comparados por cien.

Se desvelan métodos para estimular en un sujeto una respuesta inmunitaria protectora o terapéutica contra una bacteria estafilococo, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que incluye (i) una composición inmunógena que comprende al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes, p. ej., un dominio 1-2 de Coa (véase, TABLA DE SECUENCIAS N.º 1 (SEQ ID NO: 33-37) o SEQ ID NO: 41) o un dominio 1-2 de vWbp (véase, TABLA DE SECUENCIAS N.º 2 (SEQ ID NO: 38-40)) o un homólogo de los mismos; o, (ii) un polipéptido recombinante que comprende al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes u homólogos de los mismos; o, (iii) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica los al menos dos dominios 1-2 estafilocócicos diferentes u homólogos de los mismos, o (iv) administrar cualquiera de (i)-(iii) con cualquier combinación o permutación de proteínas bacterianas descritas en el presente documento. En una divulgación preferida, la composición no es una bacteria estafilococo. En determinada divulgación, el sujeto es un ser humano o una vaca. La composición puede formularse en una formulación farmacéuticamente aceptable. Los estafilococos pueden ser *Staphylococcus aureus*.

Se desvelan vacunas que comprenden una composición farmacéuticamente aceptable que tiene al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes descritos en el presente documento, o cualquier otra combinación o permutación de proteína(s) o péptido(s) descrita en el presente documento, en donde la composición es capaz de estimular una respuesta inmunitaria contra una bacteria estafilococo. La vacuna puede comprender al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes descritos en el presente documento, o cualquier otra combinación o permutación de proteína(s) o péptido(s) descrita. En determinada divulgación, al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes descritos en el presente documento, o cualquier otra combinación o permutación de proteína(s) o péptido(s) descrita, se multimerizan, p. ej., dimerizan o concatamerizan. En una divulgación adicional, la composición de la vacuna está contaminada por menos de aproximadamente 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,05 % (o cualquier intervalo derivable del mismo) de otras proteínas estafilocócicas. Una composición puede comprender además un polipéptido distinto de coagulasa aislado. Normalmente, la vacuna comprende un adyuvante. En determinada divulgación, una proteína o un péptido de la invención, está unido (de manera covalente o no covalente) al adyuvante, preferentemente el adyuvante se conjuga químicamente con la proteína.

En una otra divulgación adicional, una composición de vacuna es una composición farmacéuticamente aceptable que tiene un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido recombinante que contiene al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes descritos en el presente documento, o cualquier otra combinación o permutación de proteína(s) o péptido(s) descritos en el presente documento, en donde la composición es capaz de estimular una respuesta inmunitaria contra una bacteria estafilococo. En determinada divulgación, el ácido nucleico recombinante contiene un promotor heterólogo. Preferentemente, el ácido nucleico recombinante es un vector. Más preferentemente, el vector es un plásmido o un vector vírico. En alguna divulgación, la vacuna incluye una bacteria recombinante, no estafilocócica, que contiene el ácido nucleico. Los no estafilococos recombinantes pueden ser *Salmonella* u otra bacteria grampositiva. La vacuna puede comprender un excipiente farmacéuticamente aceptable, más preferentemente un adyuvante.

Se desvelan métodos para estimular en un sujeto una respuesta inmunitaria protectora o terapéutica contra una bacteria estafilococo, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición de al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes descritos en el presente documento, o un polipéptido recombinante que contiene al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes, o un ácido nucleico que lo codifica, y que además comprende una o más de una proteína Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp o vWh o péptido de las mismas. La composición puede comprender una bacteria no estafilocócica. La composición puede formularse en una formulación farmacéuticamente aceptable. Los estafilococos para los que se trata a un sujeto pueden ser *Staphylococcus aureus*. Los métodos de divulgación también pueden incluir adicionalmente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o más factores de virulencia secretados y/o proteínas de superficie celular, tales como Eap, Ebh, Emp, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp o vWh en diversas combinaciones. Una formulación de vacuna puede incluir Eap, Ebh, Emp, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp y vWh.

Una combinación de antígenos puede incluir (1) al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes e IsdA; (2) al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes y ClfB; (3) al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes y SdrD; (4) al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes y Hla o variante de Hla; (5) al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes y ClfB, SdrD y Hla o variante de Hla; (6) al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes, IsdA, SdrD y Hla o variante de Hla; (7) al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes, IsdA, ClfB y Hla o variante de Hla; (8) al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes, IsdA, ClfB y SdrD; (9) al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes, IsdA, ClfB, SdrD y Hla o variante de Hla; (10) al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes, IsdA, ClfB y SdrD; (11) al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes, IsdA, SdrD y Hla o variante de Hla; (12) al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes, IsdA y Hla o variante de Hla; (13) al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes, IsdA, ClfB y Hla o variante de Hla; (14) al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes, ClfB y SdrD; (15) al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes, ClfB y Hla o variante de Hla; o (16) al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes, SdrD y Hla o variante de Hla.

Una bacteria que administra una composición de la invención estará limitada o atenuada con respecto al crecimiento prolongado o persistente o la formación de abscesos. Al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes se pueden sobreexpresar en una bacteria atenuada para mejorar o complementar adicionalmente una respuesta inmunitaria o formulación de vacuna.

La expresión "proteína EsxA" se refiere a una proteína que incluye polipéptidos de EsxA de tipo silvestre aislados de la bacteria estafilococo y segmentos de los mismos, así como variantes que estimulan una respuesta inmunitaria contra proteínas EsxA de la bacteria estafilococo.

La expresión "proteína EsxB" se refiere a una proteína que incluye polipéptidos de EsxB de tipo silvestre aislados de la bacteria estafilococo y segmentos de los mismos, así como variantes que estimulan una respuesta inmunitaria contra proteínas EsxB de la bacteria estafilococo.

La expresión "proteína SdrD" se refiere a una proteína que incluye polipéptidos de SdrD de tipo silvestre aislados de la bacteria estafilococo y segmentos de los mismos, así como variantes que estimulan una respuesta inmunitaria contra proteínas SdrD de la bacteria estafilococo.

La expresión "proteína SdrE" se refiere a una proteína que incluye polipéptidos de SdrE de tipo silvestre aislados de la bacteria estafilococo y segmentos de los mismos, así como variantes que estimulan una respuesta inmunitaria contra proteínas SdrE de la bacteria estafilococo.

La expresión "proteína IsdA" se refiere a una proteína que incluye polipéptidos de IsdA de tipo silvestre aislados de la bacteria estafilococo y segmentos de los mismos, así como variantes que estimulan una respuesta inmunitaria contra proteínas IsdA de la bacteria estafilococo.

La expresión "proteína IsdB" se refiere a una proteína que incluye polipéptidos de IsdB de tipo silvestre aislados de la bacteria estafilococo y segmentos de los mismos, así como variantes que estimulan una respuesta inmunitaria contra proteínas IsdB de la bacteria estafilococo.

La expresión "proteína Eap" se refiere a una proteína que incluye polipéptidos de Eap de tipo silvestre aislados de la bacteria estafilococo y segmentos de los mismos, así como variantes que estimulan una respuesta inmunitaria contra proteínas Eap de la bacteria estafilococo.

La expresión "proteína Ebh" se refiere a una proteína que incluye polipéptidos de Ebh de tipo silvestre aislados de la bacteria estafilococo y segmentos de los mismos, así como variantes que estimulan una respuesta inmunitaria contra proteínas Ebh de la bacteria estafilococo.

La expresión "proteína Emp" se refiere a una proteína que incluye polipéptidos de Emp de tipo silvestre aislados de la bacteria estafilococo y segmentos de los mismos, así como variantes que estimulan una respuesta inmunitaria contra proteínas Emp de la bacteria estafilococo.

5 La expresión "proteína EsaB" se refiere a una proteína que incluye polipéptidos de EsaB de tipo silvestre aislados de la bacteria estafilococo y segmentos de los mismos, así como variantes que estimulan una respuesta inmunitaria contra proteínas EsaB de la bacteria estafilococo.

10 La expresión "proteína EsaC" se refiere a una proteína que incluye polipéptidos de EsaC de tipo silvestre aislados de la bacteria estafilococo y segmentos de los mismos, así como variantes que estimulan una respuesta inmunitaria contra proteínas EsaC de la bacteria estafilococo.

15 La expresión "proteína SdrC" se refiere a una proteína que incluye polipéptidos de SdrC de tipo silvestre aislados de la bacteria estafilococo y segmentos de los mismos, así como variantes que estimulan una respuesta inmunitaria contra proteínas SdrC de la bacteria estafilococo.

20 La expresión "proteína ClfA" se refiere a una proteína que incluye polipéptidos de ClfA de tipo silvestre aislados de la bacteria estafilococo y segmentos de los mismos, así como variantes que estimulan una respuesta inmunitaria contra proteínas ClfA de la bacteria estafilococo.

La expresión "proteína ClfB" se refiere a una proteína que incluye polipéptidos de ClfB de tipo silvestre aislados de la bacteria estafilococo y segmentos de los mismos, así como variantes que estimulan una respuesta inmunitaria contra proteínas ClfB de la bacteria estafilococo.

25 La expresión "proteína CoA" se refiere a una proteína que incluye polipéptidos de CoA de tipo silvestre aislados de la bacteria estafilococo y segmentos de los mismos, así como variantes que estimulan una respuesta inmunitaria contra proteínas CoA de la bacteria estafilococo.

30 La expresión "proteína Hla" se refiere a una proteína que incluye polipéptidos de Hla de tipo silvestre aislados de la bacteria estafilococo y segmentos de los mismos, así como variantes que estimulan una respuesta inmunitaria contra proteínas Hla de la bacteria estafilococo.

35 La expresión "proteína IsdC" se refiere a una proteína que incluye polipéptidos de IsdC de tipo silvestre aislados de la bacteria estafilococo y segmentos de los mismos, así como variantes que estimulan una respuesta inmunitaria contra proteínas IsdC de la bacteria estafilococo.

40 La expresión "proteína SasF" se refiere a una proteína que incluye polipéptidos de SasF de tipo silvestre aislados de la bacteria estafilococo y segmentos de los mismos, así como variantes que estimulan una respuesta inmunitaria contra proteínas SasF de la bacteria estafilococo.

La expresión "proteína vWbp" se refiere a una proteína que incluye polipéptidos de vWbp (proteína de unión al factor de von Willebrand) de tipo silvestre, aislados de la bacteria estafilococo y segmentos de los mismos, así como variantes que estimulan una respuesta inmunitaria contra proteínas vWbp de la bacteria estafilococo.

45 La expresión "proteína vWh" se refiere a una proteína que incluye polipéptidos de vWh (homólogo de la proteína de unión al factor de von Willebrand) de tipo silvestre, aislados de la bacteria estafilococo y segmentos de los mismos, así como variantes que estimulan una respuesta inmunitaria contra proteínas vWh de la bacteria estafilococo.

50 Una respuesta inmunitaria se refiere a una respuesta humoral, una respuesta celular o una respuesta tanto humoral como celular en un organismo. Una respuesta inmunitaria puede medirse mediante ensayos que incluyen ensayos que miden la presencia o la cantidad de anticuerpos que reconocen específicamente una proteína o proteína de superficie celular, ensayos que miden la activación o proliferación de linfocitos T y/o ensayos que miden la modulación en términos de actividad o expresión de una o más citocinas.

55 Una composición puede incluir un polipéptido, un péptido o una proteína que es o es al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una proteína EsxA.

Una composición puede incluir un polipéptido, un péptido o una proteína que es o es al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una proteína EsxB.

60 Una composición puede incluir un polipéptido, un péptido o una proteína que es o es al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una proteína SdrD.

65 Una composición puede incluir un polipéptido, un péptido o una proteína que es o es al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una proteína SdrE.

Una composición puede incluir un polipéptido, un péptido o una proteína que es o es al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una proteína LsdA.

5 Una composición puede incluir un polipéptido, un péptido o una proteína que es o es al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una proteína LsdB.

Las composiciones pueden incluir un polipéptido, un péptido o una proteína que es o es al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una proteína EsaB.

10 Una composición puede incluir un polipéptido, un péptido o una proteína que es o es al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una proteína ClfB.

Una composición puede incluir un polipéptido, un péptido o una proteína que es o es al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una proteína LsdC.

15 Una composición puede incluir un polipéptido, un péptido o una proteína que es o es al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una proteína SasF.

20 Una composición puede incluir un polipéptido, un péptido o una proteína que es o es al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una proteína SdrC.

Una composición puede incluir un polipéptido, un péptido o una proteína que es o es al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una proteína ClfA.

25 Una composición puede incluir un polipéptido, un péptido o una proteína que es o es al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una proteína Eap.

Una composición puede incluir un polipéptido, un péptido o una proteína que es o es al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una proteína Ebh.

30 Una composición puede incluir un polipéptido, un péptido o una proteína que es o es al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una proteína Emp.

35 Una composición puede incluir un polipéptido, un péptido o una proteína que es o es al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una proteína EsaC. La secuencia de polipéptidos de EsaC se puede encontrar en las bases de datos de proteínas e incluye los números de referencia ZP_02760162 (GI: 168727885), NP_645081.1 (GI:21281993) y NP_370813.1 (GI:15923279).

40 Una composición puede incluir un polipéptido, un péptido o una proteína que es o es al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una proteína Coa.

Una composición puede incluir un polipéptido, un péptido o una proteína que es o es al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una proteína Hla.

45 Una composición puede incluir un polipéptido, un péptido o una proteína que es o es al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una proteína vWa.

Una composición puede incluir un polipéptido, un péptido o una proteína que es o es al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una proteína vWbp.

50 Un polipéptido o segmento/fragmento puede tener una secuencia que sea al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % o más, idéntica a la secuencia de aminoácidos del polipéptido de referencia. El término "similitud" se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia que tiene un determinado porcentaje de aminoácidos que son idénticos al polipéptido de referencia o constituyen sustituciones conservadoras con los polipéptidos de referencia.

Los polipéptidos descritos en el presente documento pueden incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más aminoácidos variantes dentro de al menos, o como máximo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223,

224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 300, 400, 500, 550, 1000 o más aminoácidos contiguos, o cualquier intervalo derivable de los mismos, de la secuencia de la TABLA DE SECUENCIAS N.º 1 (SEQ ID NO: 33-37) o de la TABLA DE SECUENCIAS N.º 2 (SEQ ID NO: 38-41).

5 Un segmento polipeptídico como se describe en el presente documento puede incluir 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 300, 400, 500, 550, 1000 o más aminoácidos contiguos, o cualquier intervalo derivable de los mismos, de la secuencia de la TABLA DE SECUENCIAS N.º 1 (SEQ ID NO: 33-37) o de la TABLA DE SECUENCIAS N.º 2 (SEQ ID NO: 38-41).

20 En una divulgación, una composición puede incluir un polinucleótido que es o es al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína Coa. En determinada divulgación, la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína Coa de la cepa USA300 tendrá toda o parte de la secuencia de ácido nucleico proporcionada en el presente documento. En determinada divulgación, la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína Coa de la cepa N315 tendrá toda o parte de la secuencia de ácido nucleico proporcionada en el presente documento. En determinada divulgación, la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína Coa de la cepa MRSA252 tendrá toda o parte de la secuencia de ácido nucleico proporcionada en el presente documento. En determinada divulgación, la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína Coa de la cepa WIS tendrá toda o parte de la secuencia de ácido nucleico proporcionada en el presente documento. En determinada divulgación, la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína Coa de la cepa MU50 tendrá toda o parte de la secuencia de ácido nucleico proporcionada en el presente documento. En determinada divulgación, la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína Coa de la cepa 85/2082 tendrá toda o parte de la secuencia de ácido nucleico proporcionada en el presente documento. En determinada divulgación, la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína Coa de la cepa Newman tendrá toda o parte de la secuencia de ácido nucleico proporcionada en el presente documento.

40 En una divulgación, una composición puede incluir un polinucleótido que es o es al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión vWbp. En determinada divulgación, la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína vWbp de la cepa USA300 tendrá toda o parte de la secuencia de ácido nucleico proporcionada en el presente documento. En determinada divulgación, la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína vWbp de la cepa N315 tendrá toda o parte de la secuencia de ácido nucleico proporcionada en el presente documento. En determinada divulgación, la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína vWbp de la cepa Newman tendrá toda o parte de la secuencia de ácido nucleico proporcionada en el presente documento. En determinada divulgación, la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína vWbp de la cepa MRSA252 tendrá toda o parte de la secuencia de ácido nucleico proporcionada en el presente documento. En determinada divulgación, la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína vWbp de la cepa MW2 tendrá toda o parte de la secuencia de ácido nucleico proporcionada en el presente documento.

50 Una composición puede incluir un polinucleótido que es o es al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio 1-2 de Coa. En determinada divulgación, la secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio 1-2 de Coa de la cepa N315 tendrá toda o parte de la secuencia de ácido nucleico proporcionada en el presente documento. En determinada divulgación, la secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio 1-2 de Coa de la cepa MW2 tendrá toda o parte de la secuencia de ácido nucleico proporcionada en el presente documento. En determinada divulgación, la secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio 1-2 de Coa de la cepa MRSA252 tendrá toda o parte de la secuencia de ácido nucleico proporcionada en el presente documento. En determinada divulgación, la secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio 1-2 de Coa de la cepa WIS tendrá toda o parte de la secuencia de ácido nucleico proporcionada en el presente documento.

65 En una divulgación, una composición puede comprender un polinucleótido que es o es al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una secuencia de ácido nucleico que codifica cinco dominios 1-2 de Coa diferentes de las cepas WIS, MRSA252, N315, MW2 y USA300, respectivamente. En una divulgación, la secuencia de ácido nucleico que codifica cinco dominios 1-2 de Coa diferentes tendrá toda o parte de la secuencia de ácido nucleico proporcionada en el presente documento.

En una divulgación, una composición puede incluir un polinucleótido que es o es al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico o similar a una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio 1-2 de vWbp. En una divulgación, la secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio 1-2 de vWbp de la cepa N315 tendrá toda o parte de la secuencia de ácido nucleico proporcionada en el presente documento. En una divulgación, la secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio 1-2 de vWbp de la cepa MW2 tendrá toda o parte de la secuencia de ácido nucleico proporcionada en el presente documento. En una divulgación, la secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio 1-2 de vWbp de la cepa MRSA252 tendrá toda o parte de la secuencia de ácido nucleico proporcionada en el presente documento.

Las composiciones pueden formularse en una composición farmacéuticamente aceptable. En determinados aspectos de la invención, la bacteria estafilococo es una bacteria *S. aureus*.

En aspectos adicionales, una composición puede administrarse más de una vez al sujeto y puede administrarse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o más veces. La administración de las composiciones incluye oral, parenteral, subcutánea, intramuscular, intravenosa o diversas combinaciones de las mismas, incluyendo inhalación o aspiración.

En otra divulgación adicional, una composición comprende una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido descrito en el presente documento o segmentos/fragmentos del mismo. Normalmente, una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido descrito en el presente documento contiene un promotor heterólogo. En determinada divulgación, una molécula de ácido nucleico recombinante de la invención es un vector, en otra divulgación más, el vector es un plásmido. En determinada divulgación, el vector es un vector vírico. En determinada divulgación, una composición incluye una bacteria recombinante, no estafilocócica que contiene o expresa un polipéptido descrito en el presente documento. La bacteria recombinante no estafilocócica puede ser *Salmonella* u otra bacteria grampositiva. Una composición se administra normalmente a mamíferos, tales como sujetos humanos, pero se contempla la administración a otros animales que son capaces de inducir una respuesta inmunitaria. En una divulgación adicional, la bacteria estafilococo que contiene o expresa el polipéptido es *Staphylococcus aureus*. En una divulgación adicional, la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria protectora.

En una divulgación adicional, una composición comprende una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica todo o parte de una o más de una proteína Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, SpA, vWbp o vWh o péptido o variante de las mismas. Los antígenos estafilocócicos adicionales que pueden usarse en combinación con los polipéptidos descritos en el presente documento incluyen la proteína de unión a vitronectina de 52 kDa (documento WO 01/60852), Aaa, Aap, Ant, autolisina glucosaminidasa, autolisina amidasa, Cna, proteína de unión a colágeno (documento US6288214), EFB (FIB), proteína de unión a elastina (EbpS), EPB, FbpA, proteína de unión a fibrinógeno (documento US6008341), proteína de unión a fibronectina (documento US5840846), FnbA, FnbB, GehD (documento US 2002/0169288), HarA, HBP, transportador ABC inmunodominante, IsaA/PisA, receptor de laminina, lipasa GehD, MAP, transportador de Mg²⁺, análogo de MHC II (documento US5648240), MRPII, Npasa, proteína activadora de ARN III (RAP), SasA, SasB, SasC, SasD, SasK, SBI, SdrF (documento WO 00/12689), SdrG / Fig (documento WO 00/12689), SdrH (documento WO 00/12689), exotoxinas SEA (documento WO 00/02523), exotoxinas SEB (documento WO 00/02523), transportador ABC de SitC y Ni, proteína de unión a SitC/MntC/saliva (documento US5.801.234), SsaA, SSP-1, SSP-2 y/o proteína de unión a vitronectina. En una divulgación en particular, una bacteria es una bacteria recombinante no estafilocócica, tal como una *Salmonella* u otras bacterias grampositivas.

Las composiciones analizadas en el presente documento se administran normalmente a sujetos humanos, pero se contempla la administración a otros animales que son capaces de inducir una respuesta inmunitaria a una bacteria estafilococo, en particular ganado bovino, caballos, cabras, ovejas y otros animales domésticos, es decir, mamíferos.

En determinados aspectos, la bacteria estafilococo es un *Staphylococcus aureus*. En realizaciones adicionales, la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria protectora. En otros aspectos más, las composiciones de la invención pueden usarse para prevenir, aliviar, reducir o tratar la infección de tejidos o glándulas, p. ej., glándulas mamarias, en particular mastitis y otras infecciones. Otros métodos divulgados incluyen la reducción profiláctica de la carga bacteriana en un sujeto que no presenta signos de infección, en particular los sujetos sospechosos o en riesgo de ser colonizados por una bacteria diana, p. ej., pacientes que están o van a estar en riesgo o susceptibles a infección durante una estancia en el hospital, tratamiento y/o recuperación.

Cualquier realización analizada con respecto a un aspecto de la invención se aplica también a otros aspectos de la invención. En particular, cualquier realización analizada en el contexto de una composición que comprende al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes puede implementarse con respecto a otros antígenos, tales como Eap, Ebh, Emp, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp, vWh, proteína de unión a vitronectina de 52 kDa (documento WO 01/60852), Aaa, Aap, Ant, autolisina glucosaminidasa, autolisina amidasa, Cna, proteína de unión a colágeno (documento US6288214), EFB (FIB), proteína de unión a elastina (EbpS), EPB, FbpA, proteína de unión a fibrinógeno (documento US6008341), proteína de unión a fibronectina (documento US5840846), FnbA, FnbB, GehD (documento US 2002/0169288), HarA, HBP,

transportador ABC inmunodominante, IsaA/PisA, receptor de laminina, lipasa GehD, MAP, transportador de Mg²⁺, análogo de MHC II (documento US5648240), MRPII, Npasa, proteína activadora de ARN III (RAP), SasA, SasB, SasC, SasD, SasK.SBI, SdrF (documento WO 00/12689), SdrG / Fig (documento WO 00/12689), SdrH (documento WO 00/12689), exotoxinas SEA (documento WO 00/02523), exotoxinas SEB (documento WO 00/02523), transportador ABC de SitC y Ni, proteína de unión a SitC/MntC/saliva (documento US5.801.234), SsaA, SSP-1, SSP-2 y/o proteína de unión a vitronectina (o ácidos nucleicos), y viceversa. También se entiende que uno o más cualesquiera de Eap, Ebh, Emp, EsaC, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp, vWh, proteína de unión a vitronectina de 52 kDa (documento WO 01/60852), Aaa, Aap, Ant, autolisina glucosaminidasa, autolisina amidasa, Cna, proteína de unión a colágeno (documento US6288214), EFB (FIB), proteína de unión a elastina (EbpS), EPB, FbpA, proteína de unión a fibrinógeno (documento US6008341), proteína de unión a fibronectina (documento US5840846), FnbA, FnbB, GehD (documento US 2002/0169288), HarA, HBP, transportador ABC inmunodominante, IsaA/PisA, receptor de laminina, lipasa GehD, MAP, transportador de Mg²⁺, análogo de MHC II (documento US5648240), MRPII, Npasa, proteína activadora de ARN III (RAP), SasA, SasB, SasC, SasD, SasK.SBI, SdrF (documento WO 00/12689), SdrG / Fig (documento WO 00/12689), SdrH (documento WO 00/12689), exotoxinas SEA (documento WO 00/02523), exotoxinas SEB (documento WO 00/02523), transportador ABC de SitC y Ni, proteína de unión a SitC/MntC/saliva (documento US5.801.234), SsaA, SSP-1, SSP-2 y/o proteína de unión a vitronectina puede excluirse específicamente de una composición reivindicada.

Las realizaciones incluyen composiciones que contienen o no contienen una bacteria. Una composición puede incluir o no una bacteria estafilocócica atenuada o viable o intacta. En determinados aspectos, la composición comprende una bacteria que no es una bacteria estafilocócica o que no contiene bacterias estafilocócicas. En determinada divulgación, una composición bacteriana comprende un aislado o expresado recombinantemente de al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes descritos en el presente documento o un nucleótido que los codifica. La composición puede ser o incluir una bacteria estafilococo modificada por ingeniería genética recombinante que se ha alterado de una manera que comprende alterar específicamente la bacteria con respecto a un factor de virulencia secretado o proteína de superficie celular. Por ejemplo, la bacteria puede modificarse de manera recombinante para expresar más factor de virulencia o proteína de superficie celular de lo que expresaría si no se modificara.

El término "aislado" puede referirse a un ácido nucleico o polipéptido que está sustancialmente exento de material celular, material bacteriano, material vírico o medio de cultivo (cuando se produce mediante técnicas de ADN recombinante) de su fuente de origen, o precursores químicos u otros productos químicos (cuando se sintetizan químicamente). Por otro lado, un compuesto aislado se refiere a uno que puede administrarse a un sujeto como un compuesto aislado; en otras palabras, el compuesto no puede considerarse simplemente "aislado" si está adherido a una columna o incluido en un gel de agarosa. Por otro lado, un "fragmento de ácido nucleico aislado" o "péptido aislado" es un fragmento de ácido nucleico o proteína que no se produce de manera natural como un fragmento y/o no está normalmente en el estado funcional.

Los restos, tales como polipéptidos, péptidos, antígenos o inmunógenos, pueden conjugarse o unirse covalentemente o no covalentemente con otros restos tales como adyuvantes, proteínas, péptidos, soportes, restos de fluorescencia o marcadores. El término "conjugado" o "inmunoconjugado" se usa ampliamente para definir la asociación operativa de un resto con otro agente y no se pretende que haga referencia únicamente a ningún tipo de asociación operativa y en particular no se limita a la "conjugación" química. Se contemplan en particular proteínas de fusión recombinantes. Las composiciones de la invención pueden comprender además un adyuvante o un excipiente farmacéuticamente aceptable. Un adyuvante puede acoplarse de manera covalente o no covalente a un polipéptido o péptido de la invención. En determinados aspectos, el adyuvante está conjugado químicamente con una proteína, un polipéptido o un péptido.

El término "proporcionar" se usa según su significado ordinario para indicar "suministrar o facilitar para su uso". En algunas realizaciones, la proteína se proporciona directamente administrando la proteína, mientras que, en otras realizaciones, la proteína se proporciona eficazmente administrando un ácido nucleico que codifica la proteína. La divulgación contempla composiciones que comprenden diversas combinaciones de ácido nucleico, antígenos, péptidos y/o epítopos.

El sujeto tendrá (p. ej., se le diagnostica una infección estafilocócica), se sospechará que tiene o estará en riesgo de desarrollar una infección estafilocócica. Las composiciones de la presente invención incluyen composiciones inmunógenas en donde el o los antígenos o epítopos están contenidos en una cantidad eficaz para lograr el fin pretendido. De manera más específica, una cantidad eficaz significa una cantidad de principios activos necesarios para estimular o inducir una respuesta inmunitaria o proporcionar resistencia a, alivio de o mitigación de la infección. En aspectos más específicos, una cantidad eficaz previene, alivia o mejora los síntomas de una enfermedad o afección o prolonga la supervivencia del sujeto que se trata. La determinación de la cantidad eficaz está dentro de la capacidad de los expertos en la materia, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento. Para cualquier preparación de los usos de la invención, puede estimarse una cantidad o dosis eficaz inicialmente a partir de estudios *in vitro*, cultivo celular y/o ensayos con modelos animales. Por ejemplo, se puede formular una dosis en modelos animales para lograr una respuesta inmunitaria o concentración o título de anticuerpos en circulación deseados. Dicha información se puede utilizar para determinar con más precisión las

dosis útiles en seres humanos.

El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para dar a entender "y/o" a menos que se indique explícitamente que se refiera solo a alternativas o las alternativas sean mutuamente excluyentes, aunque la divulgación respalda una definición que se refiere solo a alternativas y a "y/o". También se contempla que todo lo que se enumere usando el término "o" también puede excluirse de manera específica.

A lo largo de la presente solicitud, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la desviación típica de error para el dispositivo o método que se emplea para determinar el valor.

Siguiendo la ley de patentes habitual, las palabras "un" y "uno/a", cuando se usan junto con la expresión "que comprende" en las reivindicaciones o la memoria descriptiva, designa uno o más, a no ser que se indique específicamente.

Descripción de los dibujos

De modo que pueda entenderse en detalle el asunto en el que se obtienen las características, ventajas y objetivos mencionados anteriormente de la invención, así como otros que se aclararán, se ilustran en los dibujos adjuntos descripciones más particulares y determinadas realizaciones de la invención resumidas de manera breve anteriormente. Estos dibujos forman parte de la memoria descriptiva. Debe observarse, sin embargo, que los dibujos adjuntos ilustran determinadas realizaciones de la invención y, por lo tanto, no deben considerarse limitantes en su alcance.

FIG. 1A-1D. Respuestas inmunitarias a la coagulasa. (A) Dibujo para ilustrar la estructura primaria de la coagulasa de *S. aureus* Newman (Coa_{NM}), que se purificó a través de un marcador de His₆ N terminal de *E. coli*. La Coa_{NM} abarca los dominios D1 y D2 implicados en la unión a protrombina, el dominio conector (L) y el dominio de repetición (R), que se compone de repeticiones en tándem de una secuencia peptídica de 27 restos que se une al fibrinógeno. Además de Coa_{NM}, se purificaron los dominios D1_{Coa}, D2_{Coa}, L_{Coa} y R_{Coa}. (B) Los conejos se inmunizaron con Coa_{NM} purificada y los sueros inmunitarios se examinaron mediante ELISA para IgG en suero reactivo con Coa_{NM}, D1_{Coa}, D2_{Coa}, D12_{Coa}, L_{Coa} o CT_{Coa}. (C) La asociación de D12_{Coa} con protrombina humana o la unión de CT_{Coa} al fibrinógeno se midieron mediante ELISA y se alteraron con concentraciones crecientes de IgG de conejo dirigida contra Coa_{NM} o el antígeno de la vacuna contra la peste V10 como control. (D) Se añadieron IgG de conejo purificada por afinidad específica para Coa_{NM} (α -Co_{3NM}), D12_{Coa} (α -D12_{Coa}) o CT_{Coa} (α -CT_{Coa}) a sangre de ratón tratada con citrato y se inocularon con *S. aureus* Newman para supervisar la inhibición de la coagulación estafilocócica.

FIG. 2A-2C. Dominios de coagulasa como antígenos de vacuna. (A) Se utilizaron Coa_{NM}, D12_{Coa} y CT_{Coa} purificados recombinantes para inmunizar ratones BALB/c (n = 5) con un régimen de sensibilización-refuerzo y se analizaron los sueros inmunitarios mediante ELISA para determinar la reactividad de la IgG en suero de ratón frente a Coa_{NM}, D12_{Coa} o CT_{Coa} purificada. (B) Cohortes de ratones BALB/c (n = 10) con un régimen de sensibilización-refuerzo de Coa_{NM}, D12_{Coa} y CT_{Coa} purificados y expuestos mediante inyección intravenosa con *S. aureus* Newman (1 x 10⁸ UFC). La supervivencia de los animales se supervisó durante 10 días. (C) Se inyectó IgG de conejo purificada por afinidad específica para Coa_{NM} (α -Coa_{NM}), D12_{Coa} (α -D12_{Coa}), CT_{Coa} (α -CT_{Coa}) o V10 (α -V10) a una concentración de 5 mg/kg de peso corporal en la cavidad peritoneal de ratones BALB/c sin exposición previa. Los ratones inmunizados de manera pasiva se expusieron mediante inyección intravenosa con *S. aureus* Newman (1 x 10⁸ UFC) y la supervivencia de los animales se supervisó durante 10 días.

FIG. 3A-3D. Respuestas inmunitarias a la proteína de unión al factor de von Willebrand (vWbp). (A) Dibujo para ilustrar la estructura primaria de vWbp de *S. aureus* Newman (vWbp_{NM}), que se purificó a través de un marcador de His₆ N terminal de *E. coli*. vWbp_{NM} abarca los dominios D1 y D2 implicados en la unión de la protrombina, el dominio conector (L) y el dominio de unión a fibrinógeno (Fgb). Además de vWbp_{NM}, se purificaron los dominios D1_{vWbp}, D2_{vWbp}, L_{vWbp}, Fgb_{vWbp} y CT_{vWbp}. (B) Los conejos se inmunizaron con vWbp_{NM} purificada y los sueros inmunitarios se examinaron mediante ELISA para IgG en suero reactivo con vWbp_{NM}, la D1_{vWbp}, D2_{vWbp}, D12_{vWbp}, L_{vWbp}, Fgb_{vWbp} y la CT_{vWbp}. (C) La asociación de D12_{vWbp} con protrombina humana o la unión de CT_{vWbp} al fibrinógeno se midieron mediante ELISA y se alteraron con concentraciones crecientes de IgG de conejo dirigida contra vWbp_{NM} o el antígeno de la vacuna contra la peste V10 como control. (D) Se añadieron IgG de conejo purificada por afinidad específica para vWbp_{NM} (α -vWbp_{NM}), D12_{vWbp} (α -D12_{vWbp}) o CT_{vWbp} (α -CT_{vWbp}) a sangre de ratón tratada con citrato y se inocularon con *S. aureus* Newman para supervisar la inhibición de la coagulación estafilocócica.

FIG. 4A-4C. Dominios de proteína de unión al factor de von Willebrand (vWbp) como antígenos de vacuna. (A) Se utilizaron vWbp_{NM}, D12_{vWbp} y CT_{vWbp} purificados recombinantes para inmunizar ratones BALB/c (n = 5) con un régimen de sensibilización-refuerzo y se analizaron los sueros inmunitarios mediante ELISA para determinar la reactividad de la IgG en suero de ratón frente a vWbp_{NM}, D12_{vWbp} y CT_{vWbp} purificados. (B) Cohortes de ratones BALB/c (n = 10) con un régimen de sensibilización-refuerzo de vWbp_{NM}, D12_{vWbp} y CT_{vWbp} purificados y se expusieron mediante inyección intravenosa con *S. aureus* Newman (1 x 10⁸ UFC). La supervivencia de los

animales se supervisó durante 10 días. (C) Se inyectó IgG de conejo purificada por afinidad específica para vWb_{ppNM} (α -vWb_{ppNM}), D12_{vWbp} (α -D12_{vWbp}), CT_{vWbp} (α -CT_{vWbp}) o V10 (α -V10) a una concentración de 5 mg/kg de peso corporal en la cavidad peritoneal de ratones BALB/c sin exposición previa. Los ratones inmunizados de manera pasiva se expusieron mediante inyección intravenosa con *S. aureus* Newman (1×10^8 UFC) y la supervivencia de los animales se supervisó durante 10 días.

FIG. 5A-5F. Inmunización de ratones con vacuna de Coa_{NM}/vWb_{ppNM} y el espectro de protección de enfermedades contra diferentes aislados de *S. aureus*. (A) Se utilizaron vacuna de Coa_{NM} recombinante/vWb_{ppNM} o simulada (PBS) para inmunizar ratones BALB/c ($n = 5$) con un régimen de sensibilización-refuerzo. Los sueros inmunitarios se analizaron mediante ELISA para determinar la reactividad de IgG en suero de ratón frente a Coa_{NM} y vWb_{ppNM} purificadas. Se inmunizaron cohortes de ratones BALB/c ($n = 10$) con un régimen de sensibilización-refuerzo de vacuna de Coa_{NM} purificada/vWb_{ppNM} o simulada y se expusieron mediante inyección intravenosa con *S. aureus* USA300 (B), N315 (C), MW2 (D), Cowan I (E) o WIS (F). La supervivencia de los animales se supervisó durante 10 días.

FIG. 6A-6C Inmunogenicidad de la vacuna de Coa₄/vWb_{p2}. (A) Dibujo para ilustrar el diseño de los componentes de la vacuna de Coa₄ y vWb_{p2}. Coa₄ está compuesta por un marcador de His6 N-terminal, los dominios D12 de Coa de las cepas de *S. aureus* MRSA252, MW2, N315 y la secuencia madura de longitud completa de Coa de la cepa USA300 además de un marcador de STREP C-terminal. vWb_{p2} está compuesta por un marcador de His6 N-terminal, los dominios D12 de vWb_p de *S. aureus* N315 y la secuencia madura de longitud completa de vWb_p de la cepa USA300 además de un marcador STREP C-terminal. (B) Coa₄ y vWb_{p2} se purificaron de *E. coli* mediante cromatografía de afinidad con Ni-NTA y estreptavidina y se analizaron mediante SDS-PAGE teñida con Coomassie.

FIG. 7A-7F Inmunización de ratones con la vacuna de Coa₄/vWb_{p2} y el espectro de protección de enfermedades contra diferentes aislados de *S. aureus*. (A) Se utilizaron vacuna de Coa₄/vWb_{p2} o simulada (PBS) para inmunizar ratones BALB/c ($n = 5$) con un régimen de sensibilización-refuerzo. Los sueros inmunitarios se analizaron mediante ELISA para determinar la reactividad de IgG en suero de ratón frente a Coa₄ y vWb_{p2} purificadas. (B) Se inmunizaron cohortes de ratones BALB/c ($n = 10$) con un régimen de sensibilización-refuerzo de vacuna de Coa₄/vWb_{p2} o simulada y se expusieron mediante inyección intravenosa con *S. aureus* USA300 (B), N315 (C), MW2 (D), Cowan I (E) o WIS (F). La supervivencia de los animales se supervisó durante 10 días.

FIG. 8A-B: Alineaciones de secuencias de Coa. (A) Alineación de secuencias de ácido nucleico de Coa de cinco cepas de *S. aureus*. (B) Alineación de secuencias de aminoácidos de los dominios 1-2 de Coa seleccionados de cepas de *S. aureus*.

FIG. 9A-C: alineaciones de secuencias de vWb_p. (A) Alineación de secuencias de ácido nucleico de vWb_p de cinco cepas de *S. aureus*. (B) Alineación de secuencias de aminoácidos de vWb_p (la secuencia del dominio 1 está sombreada) de cepas seleccionadas de *S. aureus*. (C) Alineación de secuencias de aminoácidos de vWb_p de cepas seleccionadas de *S. aureus* sin los dos alelos truncados.

Descripción detallada

Staphylococcus aureus, un microbio grampositivo que coloniza la piel humana y las narinas, provoca enfermedades invasivas tales como infecciones de piel y tejidos blandos, bacteriemia, septicemia y endocarditis (Lowy 1998). La aparición de cepas resistentes a antibióticos, designadas *S. aureus* resistente a la meticilina adquirido en la comunidad (SARM-AC) o adquirido en el hospital (SARM-AH), presenta una exposición terapéutica formidable (Klevens 2008). Aunque se han iniciado varias iniciativas de desarrollo de vacunas, aún no está disponible una vacuna de *S. aureus* autorizada por la FDA (DeDent 2012).

Un sello distintivo de los aislados de *S. aureus* es su capacidad de formar coágulos cuando se inoculan en plasma o sangre humano con citrato (Much 1908). Este fenotipo se ha ligado a la secreción de coagulasa (Coa) (Cheng 2010), que se une a la protrombina y altera el sitio activo de la enzima mediante la inserción de sus restos N-terminales en el exorreceptor 1, convirtiendo de este modo el fibrinógeno en fibrina (Friedrich 2003). La forma madura de Coa se compone de los dominios D1 y D2 N-terminales, que proporcionan asociación con y activación de protrombina (Panizzi 2004) (Fig. 1A). Un dominio conector (L) conecta D12 y la región R con repeticiones en tándem de un péptido de 27 restos que se une al fibrinógeno (Panizzi 2006) (Fig. 1A). El complejo de Coa con protrombina (estafilocagulasa) convierte el fibrinógeno soluble en fibrina insoluble, formando la red de malla de un coágulo (Friedrich 2003; Kroh 2009).

Cuando se inyecta en animales, la Coa purificada coagula la sangre *in vivo* y se cree que esto promueve el escape estafilocócico de la muerte fagocítica (Hale 1945; Smith 1956). Más recientemente, la tipificación de la coagulasa, es decir, la neutralización de coagulación de *S. aureus* de citrato-plasma con antisuero específico se usó para distinguir diez tipos de Coa serológicos diferentes (Kanemitsu 2001). Los tipos de coagulasa (Coa) también se analizaron mediante secuenciación de ADN, que reveló variación significativa dentro de secuencias de *coa* para el dominio D1-2 y poca variación para las regiones conectoras y repetidas, respectivamente (Watanabe 2005). Para abordar la

cuestión de si la variación de secuencia dentro de genes *coa* de *S. aureus* es el resultado de una selección negativa, como podría producirse cuando los individuos infectados desarrollan respuestas de anticuerpos contra Coa secretada, Watanabe y colaboradores secuenciaron los genes *coa* de 126 aislados de *S. aureus*, que se analizaron simultáneamente para determinar el serotipo de coagulasa y el tipo de agrupamiento clonal (CC). Esto último se logra a través de la tipificación de secuencia de múltiples locus (MLST), que examina secuencias de siete genes diferentes (*arc*, *aro*, *glp*, *gmk*, *pta*, *tpi*, e *yqf*) (Enright 2000). Con la excepción de las cepas CC1 y CC8, la mayoría de los aislados que se han definido por MLST eran del mismo tipo de secuencia de *coa* (Watanabe 2009). Probablemente se genera variación de secuencias de *coa* a través de transferencia horizontal de genes (transducción de fagos o transformación de ADN), ya que se encuentran genes *coa* del mismo tipo de secuencia dispersos a lo largo del árbol de MLST (Watanabe 2009). Junto con la observación de que la inmunoglobulina humana agrupada neutraliza la mayoría de los tipos de coagulasa, pero no todos (Streitfeld 1959), estos resultados sugieren que la diversificación del gen *coa* puede permitir a *S. aureus* eludir las respuestas inmunitarias humores de los hospedadores con exposición previa al patógeno (Watanabe 2009). Por tanto, Coa puede representar un antígeno protector de *S. aureus* y debería analizarse cuidadosamente para determinar su posible uso como antígeno de vacuna.

Casi un siglo después de la primera descripción de la coagulasa estafilocócica, Bjerketorp y colaboradores descubrieron vWbp (Bjerketorp 2002). vWbp es una proteína secretada que, además de unirse al factor de von Willebrand, también se asocia con la protrombina para convertir el fibrinógeno en fibrina (Friedrich 2003; Kroh 2009; Bjerketorp 2004). vWbp desempeña homología de secuencia con los dominios D12 de Coa (Watanabe 2005; Bjerketorp 2004), sin embargo, su dominio C-terminal carece de los dominios L y R de Coa, que se reemplazan por sitios únicos de unión de vWF y fibrinógeno (Cheng 2010; Bjerketorp 2002). La secuenciación del genoma descubrió dos alelos de *vwb* distintos con variación en los dominios D1-2 predichos (Watanabe 2005). La inmunización de ratones con Coa o vWbp recombinante purificada solo no fue suficiente para inducir respuestas inmunitarias protectoras contra la exposición con la misma cepa de *S. aureus* de tipo coagulasa, sin embargo, anticuerpos contra ambos, Coa y vWbp, protegieron animales contra formación de abscesos y bacteriemia letal por *S. aureus* (Cheng 2010). De manera similar, mutantes de *S. aureus* Newman que carecen de *coa* y *vwb*, pero no variantes con supresiones de un solo gen, presentaron defectos significativos en modelos de ratón de formación de abscesos o bacteriemia letal (Cheng 2010). La secreción de Coa y vWbp permite que *S. aureus* se aglutine en presencia de plasma, dando lugar a lesiones tromboembólicas, así como endocarditis, y promoviendo el resultado letal de bacteriemia estafilocócica (McAdow 2011; Panizzi 2011). El bloqueo de las coagulasas con inhibidores directos univalentes de la trombina retarda el tiempo transcurrido hasta la muerte asociado con exposición a *S. aureus* letal, destacando adicionalmente la importancia de las coagulasas para la enfermedad estafilocócica (McAdow 2011).

Los primeros trabajos sobre la coagulasa demostraron que, después de la infección por *S. aureus*, los seres humanos así como los animales generan anticuerpos específicos de Coa (Tager 1948; Lominski, 1946). Cuando se transfieren a conejos sin exposición previa, estos anticuerpos pueden neutralizar la coagulación por *S. aureus* y, al menos en algunos casos, puede conferir inmunidad a la exposición con *S. aureus* (Lominski, 1949; Lominski, 1962). La inmunización activa de conejos con preparaciones que contienen coagulasa podría prolongar la vida de los conejos que se habían expuesto mediante inoculación intravenosa con dosis letales de *S. aureus* (Boake, 1956). La comparación de diferentes aislados de *S. aureus* (de tipo fago) para la inhibición de la coagulación del plasma por el antisuero de coagulasa reveló neutralización tanto específica como inespecífica del tipo de fago (Lominski 1946; Lominski 1962; Rammelkamp 1950; Duthie 1952; Harrison 1964). Estos datos apoyaron un concepto general para la existencia de tipos serológicos de Coa, que no están estrictamente vinculados a tipos de fago de *S. aureus* (Rammelkamp 1956).

Toxoide de coagulasa purificado, que abarca Coa purificada de las cepas de *S. aureus* M1 y Newman adsorbidas en fosfato de aluminio, se examinó para determinar la inmunización terapéutica de 71 pacientes con furunculosis crónica (Harrison 1963). En comparación con el placebo, la inmunización contra la coagulasa generó un aumento en los títulos de anticuerpos específicos de coagulasa, pero no logró mejorar el resultado clínico de la furunculosis crónica (Harrison 1963). Cabe observar que no se examinó el desarrollo de anticuerpos neutralizantes o la posibilidad de inmunidad específica de tipo (Harrison 1963). Por tanto, aunque los primeros trabajos revelaron la eficacia preclínica de las vacunas de subunidades de coagulasa, los estudios clínicos no consiguieron demostrar la eficacia en un ensayo en seres humanos. Ya que la mayoría de estos estudios se realizaron entre 1945 y 1965, se deben considerar las herramientas limitadas para el aislamiento de coagulasas muy purificadas, así como la incapacidad para tipificar cepas de *S. aureus* o preparaciones de vacunas de coagulasa en función de su secuencia de nucleótidos. Además, se han realizado estudios anteriores sin conocimiento de vWbp o de los mecanismos moleculares de la activación de protrombina mediada por Coa y vWbp y la escisión de fibrinógeno (Friedrich 2003; Kroh 2009).

Los inventores han observado recientemente que ambas coagulasas secretadas por *S. aureus* Newman, Coa_{NM} y vWbp_{NM}, son suficientes para que la capacidad de esta cepa provoque formación de abscesos y bacteriemia letal rápida en ratones (Cheng 2010). En experimentos de inmunización activa y pasiva, fueron necesarios anticuerpos tanto contra Coa_{NM} como contra vWbp_{NM} para conferir protección contra la formación de abscesos o bacteriemia letal (Cheng 2010). En función de estas observaciones, los inventores plantean la hipótesis de que las coagulasas pueden actuar como antígenos protectores que inducen respuestas de anticuerpos contra Coa y vWbp, que

protegen a los animales y a los seres humanos contra enfermedad por *S. aureus* (Cheng 2010). De acuerdo con este modelo, la expresión de *coa* y *vwb* es un rasgo universal de cepas de *S. aureus* (Cheng 2011). Cabe observar que el gen *coa* de aislados de *S. aureus* es variable (McCarthy 2010), con mayor variación en la secuencia de aminoácidos incluso que las repeticiones en tándem del gen de la proteína A (*spa*); la variación en *spa* se utiliza para experimentos de tipificación epidemiológica (Watanabe 2009; Koreen 2004). Aún no se han aislado mutantes de *S. aureus* que no pueden expresar *coa* de seres humanos con enfermedad estafilocócica manifiesta. El gen *vwb* es menos variable (McCarthy 2010). Analizando secuencias del genoma de *S. aureus* disponibles en la actualidad para determinar la homología de *vwb*, los inventores han identificado tres alelos. Dos de los alelos de *vwb* variaron en su secuencia codificante para el dominio D12 (*S. aureus* N315 y USA300 son representativos de estos alelos), mientras que el tercer alelo albergaba una supresión de nucleótido en el codón 102, que crea un desplazamiento de marco que da lugar a una mutación sin sentido en el codón 107 (*S. aureus* MRSA252).

Gracias a estas observaciones, los inventores examinaron las respuestas inmunitarias a las coagulasas y demostraron que los anticuerpos contra el dominio D1-2 neutralizan la coagulación estafilocócica de una manera específica de tipo. Al inyectar en ratones una vacuna de Coa₄/vWbp₂ que alberga determinantes antígenicos de los principales aislados norteamericanos [CC1, CC5 (USA100), CC8 (USA300), CC30, CC45] (Klevens 2007; Patel 2011), los ratones podrían estar protegidos contra la exposición con varias cepas de *S. aureus* diferentes.

La inmunización con Coa y vWbp de conejos o ratones generó predominantemente anticuerpos contra el dominio D1-2 de Coa_{NM} o vWbp_{NM}. Los anticuerpos específicos de D1-2 neutralizaron las actividades coagulasa de *S. aureus* Newman y, cuando se transfirieron a animales sin exposición previa, confirieron protección contra bacteriemia letal. Se produjo neutralización y protección contra enfermedades de anticuerpos específicos de Coa_{NM} y vWbp_{NM} de una manera específica de tipo, de manera similar a la inmunidad específica de tipo indicada para proteínas M de *Streptococcus pyogenes* (Lancefield 1928; Lancefield 1962) o los antígenos de pilus(T) de *S. pyogenes* y *Streptococcus agalactiae* (Mora 2005; Niccietelli 2011). A la luz del enfoque de vacunación estructural para antígenos de pilus (Nuccitelli 2011; Schneewind 2011), los inventores diseñaron dos polipéptidos que abarcan los dominios D1-2 de los principales tipos de Coa y vWbp de los aislados de *S. aureus* norteamericanos: cepas CC1, CC5, CC8, CC30 y CC45 (Tenover 2012). Los productos purificados, Coa₄ y vWbp₂, se usaron como antígenos e indujeron respuestas de anticuerpos contra los dominios D12 de cada tipo de Coa y vWbp examinado. La inmunización de ratones con Coa₄/vWbp₂ proporcionó protección contra la exposición de bacteriemia letal con cepas de *S. aureus* CC1, CC5, CC8, CC30 y CC45 representativas. Por tanto, los criterios de diseño de la vacuna de Coa₄/vWbp₂, para generar respuestas inmunitarias universales contra Coa y vWbp contra *S. aureus* clínicamente relevante, se han cumplido. Además de la neutralización específica de tipo de Coa y vWbp a través de anticuerpos dirigidos contra el dominio D12, los anticuerpos contra los dominios R (Coa) y CT (vWbp) también proporcionaron protección contra enfermedad por *S. aureus*.

I. ANTÍGENOS ESTAFILOCÓCICOS

A. Coagulasas estafilocócicas

Las coagulasas son enzimas producidas por bacterias de *Staphylococcus* que convierten el fibrinógeno en fibrina. Coa y vW_h activan la protrombina sin proteólisis (Friedrich *et al.*, 2003). El complejo de protrombina de coagulasa reconoce el fibrinógeno como un sustrato específico, convirtiéndolo directamente en fibrina. La estructura cristalina del complejo activo reveló la unión de los dominios D1 y D2 a la protrombina y la inserción de su extremo N de Ile¹-Val² en el bolsillo de Ile¹⁶, induciendo un sitio activo funcional en el zimógeno a través del cambio conformacional (Friedrich *et al.*, 2003). Exorreceptor I de α -trombina, el sitio de reconocimiento de fibrinógeno y el proexorreceptor I en protrombina están bloqueados por el D2 de Coa (Friedrich *et al.*, 2003). No obstante, la asociación del complejo tetramérico (protrombina de Coa)₂ une fibrinógeno en un sitio nuevo con alta afinidad (Panizzi *et al.*, 2006). Este modelo explica las propiedades coagulantes y la conversión eficaz del fibrinógeno por coagulasa (Panizzi *et al.*, 2006).

El fibrinógeno es una glucoproteína grande (*Mr* ~340.000) formada por tres pares de cadenas A α , B β y γ unidas covalentemente para formar un "dímero de trímeros", donde A y B designan los fibrinopéptidos liberados por la escisión de trombina (Panizzi *et al.*, 2006). La molécula alargada se pliega en tres dominios separados, un fragmento central E que contiene los extremos N de las seis cadenas y dos fragmentos D flanqueantes formados principalmente por los extremos C de cadenas B β - y γ . Estos dominios globulares están conectados por estructuras triples helicoidales largas. Los complejos de coagulasas-protrombina, que convierten el fibrinógeno humano en la fibrina autopolimerizable, no son diana de los inhibidores de trombina en circulación (Panizzi *et al.*, 2006). Por tanto, las coagulasas estafilocócicas evitan la ruta fisiológica de la coagulación sanguínea.

Todas las cepas de *S. aureus* secretan coagulasa y vWbp (Bjerketorp *et al.*, 2004; Field y Smith, 1945). Aunque trabajos iniciales informaron de contribuciones importantes de la coagulasa a la patogenia de infecciones estafilocócicas (Ekstedt y Yotis, 1960; Smith *et al.*, 1947), investigaciones más recientes con herramientas de genética molecular han puesto en duda este punto de vista al no observar fenotipos de virulencia con endocarditis, absceso cutáneo y modelos de mastitis en ratones (Moreillon *et al.*, 1995; Phonimdaeng *et al.*, 1990). Generando variantes isogénicas de *S. aureus* Newman, un aislado clínico completamente virulento (Duthie *et al.*, 1952), se

describe en el presente documento que los mutantes de *coa* presentan de hecho defectos de virulencia en un modelo de bacteriemia letal y absceso renal en ratones. En la experiencia de los inventores, *S. aureus* 8325-4 no es completamente virulento y se supone que las lesiones mutacionales en esta cepa pueden no ser capaces de revelar defectos de virulencia *in vivo*. Por otro lado, los anticuerpos inducidos contra Coa o vWbp alteran la patogenia de infecciones por *S. aureus* Newman en un grado que refleja la influencia de las supresiones génicas. Coa y vWbp contribuyen a la formación de abscesos estafilocócicos y bacteriemia letal y también pueden actuar como antígenos protectores en vacunas subunitarias.

Los estudios bioquímicos documentan el valor biológico de los anticuerpos contra Coa y vWbp. Al unirse al antígeno y bloquear su asociación con factores de coagulación, los anticuerpos evitan la formación de complejos de Coa-protrombina y vWbp-protrombina. Los estudios de transferencia pasiva revelaron la protección de animales experimentales contra la formación de abscesos estafilocócicos y la exposición letal por anticuerpos de Coa y vWbp. Por tanto, los anticuerpos neutralizantes de Coa y vWbp generan protección inmunitaria contra la enfermedad estafilocócica.

Estudios anteriores revelaron un requisito de coagulasa para resistir la fagocitosis en sangre (Smith *et al.*, 1947) y los inventores observaron un fenotipo similar para mutantes Δcoa en sangre de ratón tratada con lepirudina (véase ejemplo 3 posterior). Ya que vWbp muestra mayor afinidad por la protrombina humana que la homóloga de ratón, se sospecha que lo mismo puede ser cierto para variantes $\Delta vWbp$ en sangre humana. Además, la expresión de Coa y vWbp en lesiones de abscesos, así como su llamativa distribución en la pseudocápsula eosinófila circundante (comunidades de abscesos estafilocócicos (SAC) o la pared periférica de fibrina, sugieren que las coagulasas secretadas contribuyen al establecimiento de estas lesiones. Se ensayó esta hipótesis y, de hecho, los mutantes Δcoa eran defectuosos en el establecimiento de abscesos. Una prueba correspondiente, bloqueando la función de Coa con anticuerpos específicos, produjo el mismo efecto. Por consiguiente, se propone que la coagulación de la fibrina es un acontecimiento crítico en el establecimiento de abscesos estafilocócicos que puede ser diana para el desarrollo de vacunas protectoras. Debido a su función solapante en la protrombina humana, tanto Coa como vWbp se consideran excelentes candidatos para el desarrollo de vacunas.

A. Proteína estafilocócica A (SpA)

Todas las cepas de *Staphylococcus aureus* expresan el gen estructural para la proteína A (spa) (Jensen, 1958; Said-Salim *et al.*, 2003), un factor de virulencia bien caracterizado cuyo producto de proteína de superficie anclada a la pared celular (SpA) abarca cinco dominios de unión a inmunoglobulina de alta homología designados E, D, A, B y C (Sjodahl, 1977). Estos dominios muestran ~80 % de identidad en el nivel de aminoácidos, son de 56 a 61 restos de longitud y se organizan como repeticiones en tándem (Uhlen *et al.*, 1984). SpA se sintetiza como una proteína precursora con un péptido señal YSIK/GS N-terminal y una señal de clasificación de motivo LPXTG C-terminal (DeDent *et al.*, 2008; Schneewind *et al.*, 1992). La proteína A anclada a la pared celular se presenta en gran abundancia en la superficie estafilocócica (DeDent *et al.*, 2007; Sjoquist *et al.*, 1972). Cada uno de sus dominios de unión a inmunoglobulina está compuesto por hélices α antiparalelas que se ensamblan en un haz de tres hélices y se unen al dominio Fc de inmunoglobulina G (IgG) (Deisenhofer, 1981; Deisenhofer *et al.*, 1978), la cadena pesada VH3 (Fab) de IgM (es decir, el receptor de linfocitos B) (Graille *et al.*, 2000), el factor de von Willebrand en su dominio A1 [vWF A1 es un ligando para plaquetas] (O'Seaghda *et al.*, 2006) y el receptor del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) I (TNFRI) (Gómez *et al.*, 2006), que se presenta en las superficies de los epitelios de las vías respiratorias (Gómez *et al.*, 2004; Gómez *et al.*, 2007).

SpA impide la fagocitosis de neutrófilos de los estafilococos a través de su atributo de unión al componente Fc de IgG (Jensen, 1958; Uhlen *et al.*, 1984). Por otro lado, SpA puede activar la coagulación intravascular a través de su unión a dominios A1 del factor de von Willebrand (Hartleib *et al.*, 2000). Las proteínas plasmáticas tales como el fibrinógeno y la fibronectina actúan como puentes entre los estafilococos (ClfA y ClfB) y la integrina plaquetaria GPIIb/IIIa (O'Brien *et al.*, 2002), una actividad que se complementa a través de la asociación de la proteína A con vWF A1, lo que permite que los estafilococos capturen plaquetas a través del receptor plaquetario GPIb- α (Foster, 2005; O'Seaghda *et al.*, 2006). SpA también se une a TNFRI y esta interacción contribuye a la patogenia de la neumonía estafilocócica (Gómez *et al.*, 2004). SpA activa la señalización proinflamatoria a través de la activación mediada por TNFR1 de TRAF2, la p38/c-jun cinasa, proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) y el factor de transcripción de Rel NF-KB. La unión de SpA induce además la eliminación de TNFR1, una actividad que parece requerir la enzima convertidora de TNF (TACE) (Gómez *et al.*, 2007). Todas las actividades de SpA mencionadas anteriormente están mediadas a través de sus cinco dominios de unión a IgG y pueden ser alteradas por las mismas sustituciones de aminoácidos, inicialmente definidas por su requisito de la interacción entre la proteína A y la IgG1 humana (Cedergren *et al.*, 1993).

SpA también actúa como un superantígeno de linfocitos B al capturar la región Fab de VH3 que porta IgM, el receptor de linfocitos B (Gómez *et al.*, 2007; Goodyear *et al.*, 2003; Goodyear y Silverman, 2004; Roben *et al.*, 1995). Después de la exposición intravenosa, las mutaciones de la proteína A estafilocócica (SpA) muestran una reducción de la carga estafilocócica en tejidos de órganos y disminución drástica de la capacidad para formar abscesos (descrita en el presente documento). Durante la infección con *S. aureus* de tipo silvestre, se forman abscesos en las primeras cuarenta y ocho horas y son detectables mediante microscopía óptica de tejido renal cortado en secciones

delgadas, teñido con hematoxilina-eosina, inicialmente marcado por una afluencia de leucocitos polimorfonucleares (PMN). El día 5 de la infección, los abscesos aumentan de tamaño y encierran una población central de estafilococos, rodeados por una capa de material amorfo, eosinófilos, y una gran envoltura de PMN. La histopatología reveló necrosis masiva de PMN cerca del foco estafilocócico en el centro de las lesiones de absceso, así como un manto de fagocitos sanos. Los inventores también observaron un borde de PMN necróticos en la periferia de las lesiones de absceso, que rodeaba la pseudocápsula eosinófila que separaba el tejido renal sano de la lesión infecciosa. Las variantes estafilocócicas que carecen de proteína A no pueden establecer las características histopatológicas de los abscesos y se eliminan durante la infección.

En estudios previos, Cedergren *et al.*, (1993) diseñaron cinco sustituciones individuales en el subdominio de unión al fragmento Fc del dominio B de SpA, L17D, N28A, I31A y K35A. Estos autores crearon estas proteínas para probar datos recopilados de una estructura tridimensional de un complejo entre un dominio de SpA y Fc₁. Cedergren *et al.*, determinaron los efectos de estas mutaciones sobre la estabilidad y la unión, pero no contemplaron el uso de dichas sustituciones para la producción de un antígeno de vacuna.

Brown *et al.*, (1998) describen estudios diseñados para obtener por ingeniería genética nuevas proteínas basadas en SpA que permiten el uso de condiciones de elución más favorables cuando se usan como ligandos de afinidad. Las mutaciones estudiadas incluyeron mutaciones individuales de Q13A, Q14H, N15A, N15H, F17H, Y18F, L21H, N32H o K39H. Brown *et al.*, informan de que las sustituciones Q13A, N15A, N15H y N32H supusieron poca diferencia en los valores de constantes de disociación y que la sustitución de Y18F dio lugar a una disminución doble de la afinidad de unión en comparación con SpA de tipo silvestre. Brown *et al.*, también informan de que las sustituciones L21H y F17H disminuyen la afinidad de unión en cinco veces y cien veces, respectivamente. Los autores también estudiaron sustituciones análogas en dos dominios en tándem. Por tanto, los estudios de Brown *et al.*, se dirigieron a generar una SpA con un perfil de elución más favorable, de ahí el uso de sustituciones de His para proporcionar una alteración sensible al pH en la afinidad de unión. Brown *et al.*, no mencionan el uso de SpA como antígeno de vacuna.

Graille *et al.*, (2000) describen una estructura cristalina del dominio D de SpA y el fragmento Fab de un anticuerpo IgM humano. Graille *et al.*, definen mediante análisis de una estructura cristalina los restos de aminoácidos del dominio D que interactúan con el fragmento Fab como restos Q26, G29, F30, Q32, S33, D36, D37, Q40, N43, E47 o L51, así como los restos de aminoácidos que forman la interfaz entre los subdominios del dominio D. Graille *et al.*, definen las interacciones moleculares de estas dos proteínas, pero no dicen nada al respecto de ningún uso de sustituciones en los restos que interactúan para producir un antígeno de vacuna.

O'Seaghda *et al.*, (2006) describen estudios dirigidos a dilucidar qué subdominio del dominio D se une a vWF. Los autores generaron mutaciones individuales en los subdominios de unión a Fc o VH3, es decir, restos de aminoácidos F5A, Q9A, Q10A, F13A, Y14A, L17A, N28A, I31A, K35A, G29A, F30A, S33A, D36A, D37A, Q40A, E47A o Q32A. Los autores descubrieron que vWF se une al mismo subdominio que se une a Fc. O'Seaghda *et al.*, definen el subdominio del dominio D responsable de la unión a vWF, pero no dicen nada al respecto de ningún uso de sustituciones en los restos que interactúan para producir un antígeno de vacuna.

Gómez *et al.*, (2006) describen la identificación de los restos responsables de la activación del TNFR1 mediante el uso de mutaciones individuales de F5A, F13A, Y14A, L17A, N21A, I31A, Q32A y K35A. Gómez *et al.*, no dicen nada al respecto de ningún uso de sustituciones en los restos que interactúan en la producción de un antígeno de vacuna.

Se purificó proteína A marcada por afinidad recombinante, un polipéptido que abarca los cinco dominios de IgG (EDCAB) (Sjodahl, 1977) pero que carece de la región X C-terminal (Guss *et al.*, 1984), de *E. coli* recombinante y se usó como antígeno de vacuna (Stranger-Jones *et al.*, 2006). Debido a los atributos de SpA en la unión de la parte Fc de IgG, no se pudo medir una respuesta inmunitaria humoral específica a la proteína A (Stranger-Jones *et al.*, 2006). Los inventores han superado este obstáculo mediante la generación de SpA-DQ9,10K; D36,37A. Los ratones BALB/c inmunizados con proteína A recombinante (SpA) presentaron protección significativa contra la exposición intravenosa con cepas de *S. aureus*: una reducción logarítmica de la carga estafilocócica de 2,951 en comparación con el tipo silvestre ($P > 0,005$; prueba de t de Student) (Stranger-Jones *et al.*, 2006). Los anticuerpos específicos de SpA pueden provocar eliminación fagocítica antes de la formación de abscesos y/o afectar a la formación de la barrera eosinófila mencionada anteriormente en los abscesos que separan las comunidades estafilocócicas de las células inmunitarias, ya que estas no se forman durante la infección con cepas mutantes para proteína A. Cada uno de los cinco dominios SpA (es decir, dominios formados a partir de tres haces de hélices designados E, D, A, B y C) ejerce propiedades de unión similares (Jansson *et al.*, 1998). La solución y la estructura cristalina del dominio D se han resuelto con y sin los ligandos Fc y VH3 (Fab), que se unen a la proteína A de manera no competitiva en sitios distintos (Graille *et al.*, 2000). También son necesarias mutaciones en restos que se sabe que están implicados en la unión a IgG (FS, Q9, Q10, S11, F13, Y14, L17, N28, I31 y K35) para la unión a A1 de vWF y TNFR1 (Cedergren *et al.*, 1993; Gómez *et al.*, 2006; O'Seaghda *et al.*, 2006), mientras que los restos importantes para la interacción con VH3 (Q26, G29, F30, S33, D36, D37, Q40, N43, E47) parecen no influir en las otras actividades de unión (Graille *et al.*, 2000; Jansson *et al.*, 1998). SpA se dirige específicamente a un subconjunto de linfocitos B que expresan IgM relacionada con la familia VH3 en su superficie, es decir, receptores de linfocitos B de tipo VH3 (Roben *et al.*, 1995). Tras la interacción con SpA, estos linfocitos B proliferan y se destinan a la apoptosis, lo que conduce a la supresión

preferente y prolongada de linfocitos B de tipo innato (es decir, linfocitos B de la zona marginal y linfocitos B2 foliculares) (Goodyear *et al.*, 2003; Goodyear *et al.*, 2004).

Base molecular de la función y presentación en superficie de la proteína A. La proteína A se sintetiza como un precursor en el citoplasma bacteriano y se secreta a través de su péptido señal YSIRK en el septo, es decir, el tabique de división celular de los estafilococos (DeDent *et al.*, 2007; DeDent *et al.*, 2008). Tras la escisión de la señal de clasificación LPXTG C-terminal, la proteína A se ancla a puentes cruzados de peptidoglucano bacteriano mediante sortasa A (Mazmanian *et al.*, 1999; Schneewind *et al.*, 1995; Mazmanian *et al.*, 2000). La proteína A es la proteína de superficie más abundante de los estafilococos; la molécula es expresada prácticamente por todas las cepas de *S. aureus* (Cespedes *et al.*, 2005; Kennedy *et al.*, 2008; Said-Salim *et al.*, 2003). Los estafilococos renuevan 15-20 % de su pared celular por cada ciclo de división (Navarre y Schneewind, 1999). Las hidrolasas murinas escinden las cadenas de glucano y los péptidos de la pared del peptidoglucano, liberando de este modo al medio extracelular la proteína A con su tetrapéptido disacárido de pared celular C-terminal unido (Ton-That *et al.*, 1999). Por tanto, por diseño fisiológico, la proteína A está anclada tanto a la pared celular como presentada en la superficie bacteriana, pero también se libera a los tejidos circundantes durante la infección del hospedador (Marraffini *et al.*, 2006).

La proteína A captura inmunoglobulinas en la superficie bacteriana y esta actividad bioquímica permite el escape estafilocócico de las respuestas inmunitarias innatas y adquiridas del hospedador (Jensen, 1958; Goodyear *et al.*, 2004). Resulta interesante que la región X de la proteína A (Guss *et al.*, 1984), un dominio de repetición que une los dominios de unión a IgG a la señal de clasificación LPXTG/anclaje de la pared celular, es quizás la parte más variable del genoma estafilocócico (Said-Salim, 2003; Schneewind *et al.*, 1992). Cada uno de los cinco dominios de unión a inmunoglobulina de la proteína A (SpA), formados a partir de tres haces de hélices y designados E, D, A, B y C, ejerce propiedades estructurales y funcionales similares (Sjodahl, 1977; Jansson *et al.*, 1998). La solución y la estructura cristalina del dominio D se han resuelto con y sin los ligandos Fc y V_H3 (Fab), que se unen a la proteína A de manera no competitiva en sitios distintos (Graille 2000).

En el complejo de estructura cristalina, el Fab interactúa con la hélice II y la hélice III del dominio D a través de una superficie compuesta por cuatro cadenas β de la región VH (Graille 2000). El eje principal de la hélice II del dominio D está aproximadamente a 50° con respecto a la orientación de las cadenas y la parte interhelicoidal del dominio D está más próxima a la cadena C0. El sitio de interacción en Fab está alejado de la cadena ligera de Ig y la región constante de la cadena pesada. La interacción implica los siguientes restos del dominio D: Asp-36 de la hélice II, Asp-37 y Gln-40 en el bucle entre la hélice II y la hélice III y varios otros restos (Graille 2000). Ambas superficies de interacción están compuestas predominantemente por cadenas laterales polares, con tres residuos con carga negativa en el dominio D y dos restos con carga positiva en el Fab 2A2 internado por la interacción, proporcionando una atracción electrostática general entre las dos moléculas. De las cinco interacciones polares identificadas entre Fab y el dominio D, tres están entre cadenas laterales. Se forma un enlace salino entre Arg-H19 y Asp-36 y se crean dos enlaces de hidrógeno entre Tyr-H59 y Asp-37 y entre Asn-H82a y Ser-33. Debido a la conservación de Asp-36 y Asp-37 en los cinco dominios de unión a IgG de la proteína A, los inventores mutaron estos restos.

Los sitios SpA-D responsables de la unión a Fab están estructuralmente separados de la superficie del dominio que media en la unión a Fcγ. La interacción de Fcγ con el dominio D implica principalmente restos en la hélice I con menor participación de la hélice II (Gouda *et al.*, 1992; Deisenhofer, 1981). Con la excepción del Gln-32, un contacto menor en ambos complejos, ninguno de los restos que median en la interacción con Fcγ están implicados en la unión a Fab. Para examinar la relación espacial entre estos diferentes sitios de unión a Ig, los dominios SpA en estos complejos se han superpuesto para construir un modelo de un complejo entre Fab, el dominio D de SpA y la molécula de Fcγ. En este modelo ternario, Fab y Fcγ forman un emparedado sobre caras opuestas de la hélice II sin pruebas de impedimento estérico de ninguna de las interacciones. Estos hallazgos ilustran cómo, a pesar de su pequeño tamaño (es decir, 56-61 aa), un dominio de SpA puede presentar simultáneamente ambas actividades, lo que explica las pruebas experimentales de que las interacciones de Fab con un dominio individual no son competitivas. Los restos para la interacción entre SpA-D y Fcγ son Gln-9 y Gln-10.

Por el contrario, la ocupación de la parte Fc de IgG en el dominio D, bloquea su interacción con vWF A1 y probablemente también con TNFR1 (O'Seaghda *et al.*, 2006). También son necesarias mutaciones en restos esenciales para la unión de Fc IgG (F5, Q9, Q10, S11, F13, Y14, L17, N28, 131 y K35) para la unión a A1 de vWF y TNFR1 (O'Seaghda *et al.*, 2006; Cedergren *et al.*, 1993; Gómez *et al.*, 2006), mientras que los restos importantes para la interacción con V_H3 (Q26, G29, F30, S33, D36, D37, Q40, N43, E47) no tienen influencia en las actividades de unión de Fc IgG, A1 de vWF o TNFR1 (Jansson *et al.*, 1998; Graille *et al.*, 2000). La actividad de unión de Fab de inmunoglobulina a proteína A se dirige a un subconjunto de linfocitos B que expresan IgM relacionada con la familia V_H3 en su superficie, es decir, estas moléculas actúan como receptores de linfocitos B de tipo V_H3 (Roben *et al.*, 1995). Tras la interacción con SpA, estos linfocitos B proliferan rápidamente y después se destinan a la apoptosis, lo que conduce a la supresión preferente y prolongada de linfocitos B de tipo innato (es decir, linfocitos B de la zona marginal y linfocitos B2 foliculares) (Goodyear y Silverman, 2004; Goodyear y Silverman, 2003). Más del 40 % de los linfocitos B en circulación son dianas de la interacción de la proteína A y la familia de V_H3 representa la mayor familia de receptores de linfocitos B humanos para transmitir respuestas humorales protectoras contra patógenos (Goodyear y Silverman, 2004; Goodyear y Silverman, 2003). Por tanto, la proteína A actúa de manera análoga a

superantígenos estafilocócicos (Roben *et al.*, 1995), aunque esta última clase de moléculas, por ejemplo SEB, TSST-1, TSST-2, forman complejos con el receptor de linfocitos T para estimular de manera inadecuada las respuestas inmunitarias del hospedador y precipitar de este modo elementos característicos de la enfermedad de infecciones estafilocócicas (Roben *et al.*, 1995; Tiedemann *et al.*, 1995). Juntos, estos hallazgos documentan las contribuciones de la proteína A en el establecimiento de infecciones estafilocócicas y en la modulación de respuestas inmunitarias del hospedador.

C. Otros antígenos estafilocócicos

La investigación durante las últimas décadas ha identificado exotoxinas, proteínas de superficie y moléculas reguladoras de *S. aureus* como factores de virulencia importantes (Foster, 2005; Mazmanian *et al.*, 2001; Novick, 2003). Se ha logrado mucho progreso con respecto a la regulación de estos genes. Por ejemplo, los estafilococos realizan un censo bacteriano a través de la secreción de péptidos autoinductores que se unen con un receptor afín a una concentración umbral, activando de este modo las reacciones de fosfotransmisión y la activación transcripcional de muchos de los genes de exotoxinas (Novick, 2003). La patogenia de las infecciones estafilocócicas se basa en estos factores de virulencia (exotoxinas secretadas, exopolisacáridos y adhesinas de superficie). El desarrollo de vacunas estafilocócicas está obstaculizado por la naturaleza multifacética de los mecanismos de invasión estafilocócica. Está bien establecido que los microorganismos vivos atenuados son vacunas muy eficaces; las respuestas inmunitarias inducidas por dichas vacunas son con frecuencia de mayor magnitud y mayor duración que las producidas por inmunógenos no replicantes. Una explicación para esto puede ser que las cepas vivas atenuadas establecen infecciones limitadas en el hospedador e imitan las primeras etapas de la infección natural. Se desvelan composiciones y métodos que incluyen polipéptidos y péptidos de coagulasa variantes, en particular, uno o más dominios de coagulasa 1-2, así como otras proteínas, polipéptidos y péptidos extracelulares inmunógenos (incluyendo proteínas o péptidos secretados y de la superficie celular) de bacterias grampositivas para el uso en la mitigación o inmunización contra la infección. En realizaciones particulares, la bacteria es una bacteria estafilococo. Las proteínas, los polipéptidos o los péptidos extracelulares incluyen proteínas secretadas y de la superficie celular de las bacterias diana.

El patógeno humano *S. aureus* secreta EsxA y EsxB, dos proteínas de tipo ESAT-6, a través de la envoltura bacteriana (Burts *et al.*, 2005). *EsxA* y *EsxB* estafilocócicos están agrupados con otros seis genes en el orden de transcripción: *esxA esaA essA esaB essB essC esaC esxB*. Los acrónimos *esa*, *ess* y *esx* representan la secreción de ESAT-6 auxiliar, sistémica y extracelular, respectivamente, dependiendo de si las proteínas codificadas desempeñan una función auxiliar (*esa*) o directa (*ess*) para la secreción o se secretan (*esx*) en el medio extracelular. El grupo completo de ocho genes se denomina en el presente documento grupo *Ess*. *EsxA*, *EsxB*, *essA*, *essB* y *essC* son todos necesarios para la síntesis o secreción de *EsxA* y *EsxB*. Los mutantes que no producen *EsxA*, *EsxB* y *EssC* presentan defectos en la patogenia de abscesos murinos por *S. aureus*, lo que sugiere que este sistema de secreción especializado puede ser una estrategia general de la patogenia bacteriana humana. Se ha informado de la secreción de sustratos distintos de WXG100 por la ruta de ESX-1 para varios antígenos, incluyendo *EspA*, *EspB*, *Rv3483c* y *Rv3615c* (Fortune *et al.*, 2005; MacGurn *et al.*, 2005; McLaughlin *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2007). También se ha mostrado que la ruta de ESX-5 alternativa secreta proteínas tanto WXG100 como distintas de WXG100 en micobacterias patógenas (Abdallah *et al.*, 2007; Abdallah *et al.*, 2006).

La ruta de *Ess* de *Staphylococcus aureus* se puede ver como un módulo de secreción equipado con componentes de transporte especializados (*Ess*), factores auxiliares (*Esa*) y sustratos de secreción afines (*Esx*). *EssA*, *EssB* y *EssC* son necesarios para la secreción de *EsxA* y *EsxB*. Debido a que se ha predicho que *EssA*, *EssB* y *EssC* son proteínas transmembrana, se contempla que estas proteínas formen un aparato de secreción. Algunas de las proteínas en el grupo de genes *ess* pueden transportar de manera activa sustratos secretados (que actúan como motoras) mientras que otras pueden regular el transporte (reguladoras). Se puede lograr regulación, pero sin limitación, mediante mecanismos transcripcionales o postraduccionales para polipéptidos secretados, clasificación de sustratos específicos en ubicaciones definidas (p. ej., medio extracelular o células hospedadoras) o el momento de los acontecimientos de secreción durante la infección. En este punto, no está claro si todas las proteínas *Esx* secretadas actúan como toxinas o contribuyen indirectamente a la patogenia.

Los estafilococos se basan en la adhesión mediada por proteínas de superficie a células hospedadoras o la invasión de tejidos como estrategia para escapar de las defensas inmunitarias. Asimismo, *S. aureus* utiliza proteínas de superficie para secuestrar hierro del hospedador durante la infección. La mayoría de las proteínas de superficie implicadas en la patogenia estafilocócica portan señales de clasificación C-terminales, es decir, están unidas covalentemente a la envoltura de la pared celular por sortasa. Además, las cepas estafilocócicas que carecen de los genes necesarios para el anclaje de proteínas de superficie, es decir, sortasa A y B, presentan un defecto considerable en la virulencia en varios modelos diferentes de enfermedad en ratones. Por tanto, los antígenos proteicos de superficie representan una diana de vacuna validada ya que los genes correspondientes son esenciales para el desarrollo de la enfermedad estafilocócica y pueden aprovecharse. La superfamilia de la enzima sortasa son las transpeptidasas grampositivas responsables de anclar factores de virulencia de la proteína de superficie a la capa de la pared celular de peptidoglucano. Se han identificado dos isoformas de sortasa en *Staphylococcus aureus*, *SrtA* y *SrtB*. Se ha mostrado que estas enzimas reconocen un motivo LPXTG en proteínas del sustrato. La isoforma *SrtB* parece ser importante en la adquisición de hierro hemo y la homeostasis del hierro, mientras que la isoforma

SrtA desempeña una función crítica en la patogenia de las bacterias grampositivas al modular la capacidad de la bacteria para adherirse al tejido hospedador a través del anclaje covalente de adhesinas y otras proteínas al peptidoglucano de la pared celular. Las variantes de coagulasa, en particular, uno o más dominios de coagulasa 1-2 descritos en el presente documento pueden usarse en combinación con otras proteínas estafilocócicas tales como proteínas Coa, Eap, Ebh, Emp, EsaC, EsaB, EsxA, EsxB, Hla, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, IsdC, SasF, vWbp y/o vWh.

Se desvelan métodos y composiciones con respecto a composiciones proteicas que incluyen polipéptidos, péptidos o ácido nucleico que codifica variantes de coagulasa, en particular, uno o más dominios 1-2 de coagulasa descritos en el presente documento y otros antígenos estafilocócicos tales como otras proteínas transportadas por la ruta de Ess o sustratos de sortasa. Estas proteínas pueden modificarse mediante supresión, inserción y/o sustitución.

Los polipéptidos Esx incluyen la secuencia de aminoácidos de las proteínas Esx de bacterias del género *Staphylococcus*. La secuencia de Esx puede ser de una especie de estafilococo en particular, tal como *Staphylococcus aureus*, y puede ser de una cepa en particular, tal como Newman. En determinada divulgación, la secuencia de EsxA es SAV0282 de la cepa Mu50 (que es la misma secuencia de aminoácidos para Newman) y se puede acceder a ella usando el número de referencia de Genbank Q99WU4 (gi|68565539). En otra divulgación, la secuencia de EsxB es SAV0290 de la cepa Mu50 (que es la misma secuencia de aminoácidos para Newman) y se puede acceder a ella usando el número de referencia de Genbank Q99WT7 (gi|68565532). En otra divulgación, se pueden usar otros polipéptidos transportados por la ruta de Ess, cuyas secuencias pueden ser identificadas por un experto en la materia utilizando bases de datos y recursos accesibles por internet.

Los polipéptidos de sustrato de sortasa incluyen la secuencia de aminoácidos de proteínas SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, IsdC o SasF de bacterias del género *Staphylococcus*. La secuencia polipeptídica de sustrato de sortasa puede ser de una especie de estafilococo en particular, tal como *Staphylococcus aureus*, y puede ser de una cepa en particular, tal como Newman. En determinada divulgación, la secuencia SdrD es de la cepa N315 y se puede acceder a ella usando el número de referencia de Genbank NP_373773.1 (gi|15926240). En otra divulgación, la secuencia SdrE es de la cepa N315 y se puede acceder a ella usando el número de referencia de Genbank NP_373774.1 (gi|15926241). En otra divulgación, la secuencia de IsdA es SAV1130 de la cepa Mu50 (que es la misma secuencia de aminoácidos para Newman) y se puede acceder a ella usando el número de referencia de Genbank NP_371654.1 (gi|15924120). En otra divulgación, la secuencia de IsdB es SAV1129 de la cepa Mu50 (que es la misma secuencia de aminoácidos para Newman) y se puede acceder a ella usando el número de referencia de Genbank NP_371653.1 (gi|15924119). En otra divulgación, se pueden utilizar otros polipéptidos transportados por la ruta de Ess o procesados por sortasa, cuyas secuencias pueden ser identificadas por un experto en la materia utilizando bases de datos y recursos accesibles por internet.

Se pueden identificar ejemplos de diversas proteínas que se pueden usar en el contexto de la presente invención mediante el análisis de envíos de bases de datos de genomas bacterianos, incluyendo los números de referencia NC_002951 (GI: 57650036 y GenBank CP000046), NC_002758 (GI: 57634611 y GenBank BA000017), NC_002745 (GI: 29165615 y GenBank BA000018), NC_003923 (GI: 21281729 y GenBank BA000033), NC_002952 (GI: 49482253 y GenBank BX571856), NC_002953 (GI: 49484912 y GenBank BX571857), NC_007793 (GI: 87125858 y GenBank CP000255), NC_007795 (GI: 87201381 y GenBank CP000253).

Como se usa en el presente documento, una "proteína" o un "polipéptido" se refiere a una molécula que comprende al menos diez restos de aminoácidos. En algunas realizaciones, se emplea una versión de tipo silvestre de una proteína o un polipéptido, sin embargo, en muchas realizaciones de la invención, se emplea una proteína o un polipéptido modificado para generar una respuesta inmunitaria. Los términos descritos anteriormente pueden usarse indistintamente. Una "proteína modificada" o "polipéptido modificado" o una "variante" se refiere a una proteína o un polipéptido cuya estructura química, en particular su secuencia de aminoácidos, está alterada con respecto a la proteína o el polipéptido de tipo silvestre. En algunas realizaciones, una proteína o un polipéptido modificado/variante tiene al menos una actividad o función modificada (que reconoce que las proteínas o los polipéptidos pueden tener múltiples actividades o funciones). Se contempla específicamente que una proteína o un polipéptido modificado/variante puede alterarse con respecto a una actividad o función pero conservar una actividad o función de tipo silvestre en otros aspectos, tales como inmunogenicidad.

En determinadas realizaciones, el tamaño de una proteína o un polipéptido (de tipo silvestre o modificado) puede comprender 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775, 800, 825, 850, 875, 900, 925, 950, 975, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1750, 2000, 2250, 2500 moléculas de amino o más, y cualquier intervalo derivable de las mismas, o derivado de una secuencia de amino correspondiente descrita o a la que se hace referencia en el presente documento. Se contempla que los polipéptidos pueden mutarse mediante truncamiento, haciéndolos más cortos que su forma de tipo silvestre correspondiente, pero también podrían alterarse fusionando o conjugando una secuencia proteica heteróloga con una función en particular (p. ej., para

direccionamiento o localización, para mayor inmunogenicidad, para fines de purificación, etc.).

Como se usa en el presente documento, una "molécula de amino" se refiere a cualquier aminoácido, derivado de aminoácido o mimético de aminoácido conocido en la técnica. En determinadas realizaciones, los restos de la molécula proteica son secuenciales, sin ninguna molécula no amino que interrumpa la secuencia de restos de moléculas amino. En otras realizaciones, la secuencia puede comprender uno o más restos de moléculas no amino. En realizaciones particulares, la secuencia de restos de la molécula proteica puede ser interrumpida por uno o más restos de moléculas no amino.

En consecuencia, la expresión "composición proteica" abarca secuencias de moléculas de amino que comprenden al menos uno de los 20 aminoácidos comunes en proteínas sintetizadas de manera natural o al menos un aminoácido modificado o inusual.

Se pueden preparar composiciones proteicas mediante cualquier técnica conocida por los expertos en la materia, incluyendo (i) la expresión de proteínas, polipéptidos o péptidos a través de técnicas convencionales de biología molecular, (ii) el aislamiento de compuestos proteicos a partir de fuentes naturales o (iii) la síntesis química de materiales proteicos. Las secuencias de nucleótidos, así como las de proteínas, polipéptidos y péptidos para diversos genes se han desvelado previamente y se pueden encontrar en las bases de datos informatizadas reconocidas. Una de esas bases de datos son las bases de datos Genbank y GenPept del Centro Nacional de Información Biotecnológica (en Internet en ncbi.nlm.nih.gov/). Las regiones codificantes para estos genes pueden amplificarse y/o expresarse usando las técnicas desveladas en el presente documento o como conocerían los expertos en la materia.

Las variantes de secuencias de aminoácidos de coagulasas, en particular, de los dominios 1-2 de coagulasa, SpA y otros polipéptidos de la invención pueden ser variantes de sustitución, inserción o supresión. Una variación en un polipéptido de la invención puede afectar a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 o más aminoácidos no contiguos o contiguos del polipéptido, en comparación con el tipo silvestre. Una variante puede comprender una secuencia de aminoácidos que sea al menos 80 % o 90 %, incluyendo todos los valores e intervalos entre ellos, idéntica, a cualquier secuencia proporcionada o a la que se hace referencia en el presente documento, p. ej., una secuencia de la TABLA DE SECUENCIAS N.º 1 (SEQ ID NO: 33-37) o de la TABLA DE SECUENCIAS N.º 2 (SEQ ID NO: 38-41). Una variante puede incluir 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más aminoácidos sustitutos. Un polipéptido procesado o secretado por la ruta de Ess u otras proteínas de superficie (véase la tabla 1) o sustratos de sortasa de cualquier especie y cepa de estafilococo, se contemplan para su uso en las composiciones y los métodos desvelados en el presente documento.

Las variantes de supresión normalmente carecen de uno o más restos de la proteína nativa o de tipo silvestre. Se pueden suprimir restos individuales o se pueden suprimir varios aminoácidos contiguos. Se puede introducir un codón de parada (mediante sustitución o inserción) en una secuencia de ácido nucleico codificante para generar una proteína truncada. Los mutantes de inserción implican normalmente la adición de material en un punto no terminal en el polipéptido. Esto puede incluir la inserción de uno o más restos. También se puede generar adiciones terminales, denominadas proteínas de fusión. Estas proteínas de fusión incluyen multímeros o concatámeros de uno o más péptidos o polipéptidos descritos o a los que se hace referencia en el presente documento.

Las variantes de sustitución contienen normalmente el intercambio de un aminoácido por otro en uno o más sitios dentro de la proteína y pueden diseñarse para modular una o más propiedades del polipéptido, con o sin la pérdida de otras funciones o propiedades. Las sustituciones pueden ser conservadoras, es decir, se sustituye un aminoácido con uno de una forma y carga similar. Las sustituciones conservadoras son bien conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, los cambios de: alanina a serina; arginina a lisina; asparagina a glutamina o histidina; aspartato a glutamato; cisteína a serina; glutamina a asparagina; glutamato a aspartato; glicina a prolina; histidina a asparagina o glutamina; isoleucina a leucina o valina; leucina a valina o isoleucina; lisina a arginina; metionina a leucina o isoleucina; fenilalanina a tirosina, leucina o metionina; serina a treonina; treonina a serina; triptófano a tirosina; tirosina a triptófano o fenilalanina; y valina a isoleucina o leucina. Como alternativa, las sustituciones pueden ser no conservativas de modo que se vea afectada una función o actividad del polipéptido. Los cambios no conservadores normalmente implican la sustitución de un resto con uno que es químicamente diferente, tal como un aminoácido polar o con carga para un aminoácido no polar o sin carga, y viceversa.

Tabla 2. Proteínas de superficie ilustrativas de cepas de *S. aureus*.

SAV#	SA#	Superficie	MW2	Mu50	N315	Newman	MRSA252*	MSSA476*
SAV0111	SA0107	Spa	492	450	450	520	516	492
SAV2503	SA2291	FnBPA	1015	1038	1038	741	-	1015
SAV2502	SA2290	FnBPB	943	961	961	677	965	957
SAV0811	SA0742	ClfA	946	935	989	933	1029	928
SAV2630	SA2423	ClfB	907	877	877	913	873	905

(continuación)

SAV#	SA#	Superficie	MW2	Mu50	N315	Newman	MRSA252*	MSSA476*
Np	Np	Cna	1183	-	-	-	1183	1183
SAV0561	SA0519	SdrC	955	953	953	947	906	957
SAV0562	SA0520	SdrD	1347	1385	1385	1315	-	1365
SAV0563	SA0521	SdrE	1141	1141	1141	1166	1137	1141
Np	Np	Pls	-	-	-	-	-	-
SAV2654	SA2447	SasA	2275	2271	2271	2271	1351	2275
SAV2160	SA1964	SasB	686	2481	2481	2481	2222	685
	SA1577	SasC	2186	213	2186	2186	2189	2186
SAV0134	SA0129	SasD	241	241	241	241	221	241
SAV1130	SA0977	SasE/IsdA	350	350	350	350	354	350
SAV2646	SA2439	SasF	635	635	635	635	627	635
SAV2496		SasG	1371	525	927	-	-	1371
SAV0023	SA0022	SasH	772	-	772	772	786	786
SAV1731	SA1552	SasI	895	891	891	891	534	895
SAV1129	SA0976	SasJ/IsdB	645	645	645	645	652	645
	SA2381	SasK	198	211	211	-	-	197
	Np	SasL	-	232	-	-	-	-
SAV1131	SA0978	IsdC	227	227	227	227	227	227

Las proteínas de las composiciones de la invención pueden ser recombinantes o sintetizadas *in vitro*. Como alternativa, una proteína no recombinante o recombinante puede aislarse de bacterias. Se desvela que una bacteria que contiene dicha variante puede implementarse en composiciones y métodos. Por consiguiente, no es necesario aislar una proteína.

La expresión "codón funcionalmente equivalente" se usa en el presente documento para referirse a codones que codifican el mismo aminoácido, tales como los seis codones para arginina o serina, y también se refiere a codones que codifican aminoácidos biológicamente equivalentes (véase tabla 3, a continuación).

Tabla 3 Tabla de codones

Aminoácidos			Codones
Alanina	Ala	A	GCA GCC GCG GCU
Cisteína	Cys	C	UGC UGU
Ácido aspártico	Asp	D	GAC GAU
Ácido glutámico	Glu	E	GAA GAG
Fenilalanina	Phe	F	UUC UUU
Glicina	Gly	G	GGA GGC GGG GGU
Histidina	His	H	CAC CAU
Isoleucina	Ile	I	AUA AUC AUU
Lisina	Lys	K	AAA AAG
Leucina	Leu	L	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
Metionina	Met	M	AUG
Asparagina	Asn	N	AAC AAU
Prolina	Pro	P	CCA CCC CCG CCU
Glutamina	Gln	Q	CAA CAG
Arginina	Arg		AGA AGG CGA CGC CGG CGU
Serina	Ser	S	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
Treonina	Thr	T	ACA ACC ACG ACU
Valina	Val	V	GUA GUC GUG GUU
Triptófano	Trp	W	UGG
Tirosina	Tyr	Y	UAC UAU

También se entenderá que las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos pueden incluir restos adicionales, tales como aminoácidos N o C terminales adicionales, o secuencias 5' o 3', respectivamente, y aún ser esencialmente como se expone en una de las secuencias desveladas en el presente documento, siempre que la secuencia cumpla los criterios expuestos anteriormente, incluyendo el mantenimiento de la actividad biológica de proteínas (p. ej., inmunogenicidad) en lo que respecta a la expresión de proteínas. La adición de secuencias terminales se aplica en particular a secuencias de ácido nucleico que pueden, por ejemplo, incluir diversas secuencias no codificantes que flanquean una de las partes 5' o 3' de la región codificante.

Lo siguiente es un análisis basado en el cambio de los aminoácidos de una proteína para crear un polipéptido o péptido variante. Por ejemplo, determinados aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos en una estructura proteica con o sin pérdida apreciable de la capacidad de unión interactiva con estructuras tales como, por ejemplo, regiones de unión a antígeno de anticuerpos o sitios de unión en moléculas de sustrato. Ya que es la capacidad interactiva y la naturaleza de una proteína lo que define la actividad funcional de esa proteína, se pueden realizar determinadas sustituciones de aminoácidos en una secuencia de proteínas y en su secuencia codificante de ADN subyacente y, no obstante, producir una proteína con una propiedad deseable. Por tanto, los inventores contemplan que se pueden realizar diversos cambios en las secuencias de ADN de los genes.

Se contempla que, en las composiciones de la invención, hay entre aproximadamente 0,001 mg y aproximadamente 10 mg de polipéptido, péptido y/o proteína total por ml. La concentración de proteína en una composición puede ser de aproximadamente, al menos aproximadamente o como máximo aproximadamente 0,001, 0,010, 0,050, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0 mg/ml o más (o cualquier intervalo derivable de los mismos). De esta, aproximadamente, al menos aproximadamente o como máximo aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 % puede ser un dominio 1-2 de coagulasa o una coagulasa o su variante y se puede usar en combinación con otros péptidos o polipéptidos, tales como otros péptidos y/o antígenos bacterianos.

La presente invención contempla la administración de dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica o variantes de los mismos para su uso para efectuar una terapia preventiva o un efecto terapéutico contra el desarrollo de una enfermedad o afección asociada con la infección por un patógeno estafilocócico.

En determinados aspectos, se utilizan combinaciones de antígenos estafilocócicos en la producción de una composición inmunogénica que es eficaz en el tratamiento o la prevención de la infección estafilocócica. Las infecciones estafilocócicas avanzan a través de varias etapas diferentes. Por ejemplo, el ciclo de vida estafilocócico implica colonización comensal, inicio de la infección accediendo a tejidos adyacentes o al torrente sanguíneo y/o multiplicación anaerobia en la sangre. La interacción entre los determinantes de la virulencia de *S. aureus* y los mecanismos de defensa del hospedador puede inducir complicaciones tales como endocarditis, formación de abscesos metastásicos y síndrome de septicemia. Diferentes moléculas en la superficie de la bacteria están implicadas en diferentes etapas del ciclo de infección. Las combinaciones de determinados antígenos pueden inducir una respuesta inmunitaria que protege contra múltiples etapas de la infección estafilocócica. La eficacia de la respuesta inmunitaria se puede medir en ensayos con modelos animales y/o utilizando un ensayo opsonofagocítico.

B. Polipéptidos y producción de polipéptidos

La presente divulgación describe polipéptidos, péptidos y proteínas y fragmentos inmunogénicos de los mismos, para su uso en composiciones inmunógenas de la presente invención. Por ejemplo, los polipéptidos específicos se analizan con respecto a o se usan para inducir una respuesta inmunitaria. En realizaciones específicas, todas o parte de las proteínas de la composición inmunógena de la invención, también se pueden sintetizar en solución o sobre un soporte sólido de acuerdo con técnicas convencionales. Se encuentran disponibles en el mercado diversos sintetizadores automáticos y pueden usarse de acuerdo con protocolos conocidos. Véase, por ejemplo, Stewart y Young, (1984); Tam *et al.*, (1983); Merrifield, (1986); y Barany y Merrifield (1979).

Como alternativa, Se puede emplear tecnología de ADN recombinante en donde se inserta una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido en un vector de expresión, se transforma o se transfecta en una célula hospedadora adecuada y se cultiva en condiciones adecuadas para la expresión.

Se desvela el uso de transferencia génica a células, incluyendo microorganismos, para la producción y/o presentación de polipéptidos o péptidos. El gen para el polipéptido o péptido de interés puede transferirse a células hospedadoras adecuadas seguido de cultivo de células en las condiciones adecuadas. La generación de vectores de expresión recombinantes, y los elementos incluidos en los mismos, son bien conocidos en la técnica y se analizan brevemente en el presente documento. Como alternativa, la proteína que se va a producir puede ser una proteína endógena sintetizada de manera normal por la célula que se aísla y se purifica.

Se desvela el uso de líneas celulares de linfocitos B autólogas, que se transfectan con un vector vírico que expresa un producto inmunógeno y, más específicamente, una proteína que tiene actividad inmunógena. Otros ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamíferos incluyen células Vero y HeLa, otras líneas de linfocitos B y T, tales como CEM, 721.221, H9, Jurkat, Raji, así como líneas celulares de ovario de hámster chino, W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN y células MDCK. Además, se puede seleccionar una cepa de células hospedadoras que module la expresión de las secuencias insertadas o que modifique y procese el producto génico de la manera deseada. Dichas modificaciones (p. ej., glucosilación) y procesamiento (p. ej., escisión) de productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células hospedadoras tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y la modificación postraducciona de las proteínas. Se pueden

seleccionar líneas celulares o sistemas hospedadores adecuados para garantizar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína extraña expresada.

Se pueden usar varios sistemas de selección, incluyendo genes de timidina cinasa, hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa y adenina fosforribosiltransferasa de VHS, en células tk-, hgprt- o aprt-, respectivamente. Además, puede usarse resistencia antimetabolitos como base de la selección: para dhfr, que confiere resistencia a trimetoprim y metotrexato; gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico; neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G418; e hgro, que confiere resistencia a la higromicina.

Las células animales pueden propagarse *in vitro* en dos modos: como células no dependientes del anclaje que crecen en suspensión a lo largo de la mayor parte del cultivo o como células dependientes del anclaje que requieren unión a un sustrato sólido para su propagación (es decir, un tipo de crecimiento celular en monocapa).

Los cultivos no dependientes de anclaje o en suspensión a partir de líneas celulares continuas establecidas son los medios más ampliamente utilizados de producción a gran escala de células y productos celulares. Sin embargo, las células cultivadas en suspensión tienen limitaciones, tales como potencial tumorigénico y menor producción de proteínas que las células adherentes.

Cuando una proteína se menciona específicamente en el presente documento, es preferentemente una referencia a una proteína nativa o recombinante u opcionalmente una proteína en la que se ha eliminado cualquier secuencia señal. La proteína puede aislarse directamente de la cepa estafilocócica o producirse mediante técnicas de ADN recombinante. Los fragmentos inmunogénicos de la proteína pueden incorporarse en la composición inmunogénica de la invención. Estos son fragmentos que comprenden al menos 10 aminoácidos, 20 aminoácidos, 30 aminoácidos, 40 aminoácidos, 50 aminoácidos o 100 aminoácidos, incluyendo todos los valores e intervalos entre ellos, tomados de manera contigua de la secuencia de aminoácidos de la proteína. Además, dichos fragmentos inmunógenos son inmunológicamente reactivos con anticuerpos generados contra las proteínas estafilocócicas o con anticuerpos generados por infección de un hospedador mamífero con estafilococos. Los fragmentos inmunógenos también incluyen fragmentos que cuando se administran a una dosis eficaz, (ya sean solos o como un hapteno unido a un vehículo), inducen una respuesta inmunitaria protectora o terapéutica contra infección estafilocócica y pueden ser protectores contra infección por *S. aureus* y/o *S. epidermidis*. Dicho fragmento inmunógeno puede incluir, por ejemplo, la proteína que carece de una secuencia líder N-terminal y/o un dominio transmembrana y/o un dominio de anclaje C-terminal. En una divulgación, el fragmento inmunógeno comprende sustancialmente todo el dominio extracelular de una proteína que tiene al menos 80 % de identidad, al menos 85 % de identidad, al menos 90 % de identidad, al menos 95 % de identidad o al menos 97-99 % de identidad, incluyendo todos los valores e intervalos entre ellos, a un segmento de secuencia seleccionada de un polipéptido descrito en el presente documento.

También se incluyen en composiciones inmunógenas de la invención proteínas de fusión compuestas por una o más proteínas estafilocócicas o fragmentos inmunógenos de proteínas estafilocócicas. Dichas proteínas de fusión pueden prepararse de manera recombinante y pueden comprender una parte de al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 proteínas o segmentos estafilocócicos. Como alternativa, una proteína de fusión puede comprender múltiples partes de al menos 1, 2, 3, 4 o 5 proteínas estafilocócicas. Estas pueden combinar diferentes proteínas estafilocócicas y/o múltiples de la misma proteína o fragmento proteico, o fragmentos inmunógenos en la misma proteína (formando un multímero o un concatámero). Como alternativa, la invención también incluye proteínas de fusión individuales de proteínas estafilocócicas o fragmentos inmunógenos de las mismas, como una proteína de fusión con secuencias heterólogas, tales como un proveedor de epítomos de linfocitos T o marcadores de purificación, por ejemplo: β -galactosidasa, glutatión-S-transferasa, proteínas verdes fluorescentes (GFP), marcadores epitópicos tales como FLAG, marcador de myc, polihistidina o proteínas de superficie vírica tales como hemaglutinina del virus de la gripe o proteínas bacterianas tales como toxoide tetánico, toxoide diftérico o CRM197.

II. ÁCIDOS NUCLEICOS

La presente divulgación se refiere a polinucleótidos recombinantes que codifican las proteínas, los polipéptidos y los péptidos de la divulgación. Las secuencias de ácido nucleico para coagulasas, dominios 1-2 de coagulasas, SpA y otras proteínas bacterianas pueden usarse para preparar péptidos o polipéptidos.

Como se usa en la presente solicitud, el término "polinucleótido" se refiere a una molécula de ácido nucleico que es recombinante o se ha aislado sin ácido nucleico genómico total. Dentro del término "polinucleótido" se incluyen oligonucleótidos (ácidos nucleicos de 100 restos o menos de longitud), vectores recombinantes, incluyendo, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, fago, virus y similares. Los polinucleótidos incluyen, en determinados aspectos, secuencias reguladoras, aisladas sustancialmente de sus genes de origen natural o secuencias codificantes de proteínas. Los polinucleótidos pueden ser monocatenarios (codificantes o antisentido) o bicatenarios y pueden ser ARN, ADN (genómico, ADNc o sintético), análogos de los mismos o una combinación de los mismos. Dentro de un polinucleótido, pueden estar presentes secuencias codificantes o no codificantes adicionales, pero no es necesario.

En este sentido, la expresión "gen", "polinucleótido", o "ácido nucleico" se usa para hacer referencia a un ácido nucleico que codifica una proteína, un polipéptido o un péptido (incluyendo cualquier secuencia necesaria para

transcripción, modificación postraduccional o ubicación adecuadas). Como entenderán los expertos en la materia, esta expresión abarca secuencias genómicas, casetes de expresión, secuencias de ADNc y segmentos de ácido nucleico modificados por ingeniería genética más pequeños que expresan, o pueden adaptarse para expresar, proteínas, polipéptidos, dominios, péptidos, proteínas de fusión y mutantes. Un ácido nucleico que codifica todo o parte de un polipéptido puede contener una secuencia contigua de ácido nucleico de: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 441, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000, 1010, 1020, 1030, 1040, 1050, 1060, 1070, 1080, 1090, 1095, 1100, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 9000, 10000 o más nucleótidos, nucleósidos o pares de bases, incluyendo todos los valores e intervalos entre ellos, de un polinucleótido que codifica una o más secuencias de aminoácidos descritas en el presente documento. También se contempla que un polipéptido en particular puede estar codificado por ácidos nucleicos que contienen variaciones que tienen secuencias de ácido nucleico ligeramente diferentes pero, no obstante, codifican la misma proteína o una proteína sustancialmente similar (véase tabla 3 anterior).

La divulgación se refiere a segmentos de ácido nucleico aislados y vectores recombinantes que incorporan secuencias de ácido nucleico que codifican uno o más dominios 1-2 de coagulasa o variantes de los mismos. El término "recombinante" puede usarse junto con un polinucleótido o polipéptido y se refiere en general a un polipéptido o polinucleótido producido y/o manipulado *in vitro* o que es un producto de replicación de dicha molécula.

La divulgación se refiere a segmentos de ácido nucleico aislados y vectores recombinantes que incorporan secuencias de ácido nucleico que codifican un polipéptido o péptido de coagulasa o una variante del mismo para generar una respuesta inmunitaria en un sujeto. Los ácidos nucleicos pueden usarse en vacunas genéticas.

Los segmentos de ácido nucleico se pueden combinar con otras secuencias de ácido nucleico, tales como promotores, señales de poliadenilación, sitios de enzimas de restricción adicionales, sitios de clonación múltiples, otros segmentos codificantes y similares, de modo que su longitud total puede variar considerablemente. Por lo tanto, se contempla que se puede emplear un fragmento de ácido nucleico de casi cualquier longitud, estando la longitud total preferentemente limitada por la facilidad de preparación y uso en el protocolo de ácido nucleico recombinante previsto. En algunos casos, una secuencia de ácido nucleico puede codificar una secuencia polipeptídica con secuencias codificantes heterólogas adicionales, por ejemplo, para permitir la purificación del polipéptido, transporte, secreción, modificación postraduccional o para beneficios terapéuticos tales como direccionamiento o eficacia. Como se ha analizado anteriormente, se puede añadir un marcador u otro polipéptido heterólogo a la secuencia codificante del polipéptido modificado, en donde "heterólogo" se refiere a un polipéptido que no es el mismo que el polipéptido modificado.

La divulgación se refiere a segmentos de ácido nucleico aislados y a vectores recombinantes que incluyen, dentro de su secuencia, una secuencia contigua de ácido nucleico que codifica una de las secuencias de la TABLA DE SECUENCIAS N.º 1 (SEQ ID NO: 33-37) o de la TABLA DE SECUENCIAS N.º 2 (SEQ ID NO: 38-41) o cualquier otra secuencia de ácido nucleico que codifique coagulasas u otros factores de virulencia secretados y/o proteínas de superficie, incluyendo proteínas transportadas por la ruta de Ess o procesadas por sortasa.

La presente divulgación proporciona variantes de polinucleótidos que tienen identidad sustancial con las secuencias desveladas en el presente documento; las que comprenden al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o mayor identidad de secuencia, incluyendo todos los valores e intervalos entre ellos, en comparación con una secuencia polinucleotídica usando los métodos descritos en el presente documento (p. ej., análisis BLAST usando parámetros convencionales).

La divulgación también contempla el uso de polinucleótidos que son complementarios de todos los polinucleótidos descritos anteriormente.

A. Vectores

Los polipéptidos pueden estar codificados por una molécula de ácido nucleico comprendida en un vector. El término "vector" se usa para hacer referencia a una molécula de ácido nucleico portadora en la que se puede insertar una secuencia de ácido nucleico heteróloga para su introducción en una célula donde se pueda replicar y expresar. Una secuencia de ácido nucleico puede ser "heteróloga", lo que significa que está en un contexto extraño a la célula en la que se introduce el vector o al ácido nucleico en el que se incorpora, que incluye una secuencia homóloga de una secuencia en la célula o ácido nucleico pero en una posición dentro de la célula hospedadora o ácido nucleico donde no se encuentra habitualmente. Los vectores incluyen ADN, ARN, plásmidos, cósmidos, virus (bacteriófago, virus animales y virus vegetales) y cromosomas artificiales (p. ej., YAC). Un experto en la materia estaría bien equipado para construir un vector mediante técnicas recombinantes convencionales (por ejemplo, Sambrook *et al.*, 2001; Ausubel *et al.*, 1996). Además de codificar uno o más dominios 1-2 de coagulasa o una variante de los mismos, el vector puede codificar otras secuencias polipeptídicas, tales como uno o más péptidos bacterianos adicionales, un

marcador o un péptido potenciador de la inmunogenicidad. Los vectores útiles que codifican dichas proteínas de fusión incluyen vectores pIN (Inouye *et al.*, 1985), vectores que codifican un tramo de histidinas y vectores pGEX, para su uso en la generación de proteínas de fusión solubles de glutatión S-transferasa (GST) para su posterior purificación y separación o escisión.

La expresión "vector de expresión" se refiere a un vector que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos parte de un producto génico capaz de transcribirse. En algunos casos, las moléculas de ARN se traducen después a una proteína, un polipéptido o un péptido. Los vectores de expresión pueden contener diversas "secuencias de control", que se refieren a secuencias de ácido nucleico necesarias para la transcripción y posiblemente la traducción de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo hospedador en particular. Además de las secuencias de control que rigen la transcripción y la traducción, los vectores y los vectores de expresión pueden contener secuencias de ácido nucleico que también cumplen otras funciones y se describen en el presente documento.

1. Promotores y potenciadores

Un "promotor" es una secuencia de control. El promotor es normalmente una región de una secuencia de ácido nucleico en la que se controla el inicio y la velocidad de transcripción. Puede contener elementos genéticos a los que se pueden unir proteínas y moléculas reguladoras, tales como ARN polimerasa y otros factores de transcripción. Las expresiones "situado/a operativamente", "unido/a operativamente", "bajo control" y "bajo control transcripcional" significan que un promotor está en una ubicación y/u orientación funcional correctas en relación con una secuencia de ácido nucleico para controlar el inicio de la transcripción y/o la expresión de esa secuencia. Un promotor puede usarse o no junto con un "potenciador", que se refiere a una secuencia reguladora de acción en *cis* implicada en la activación de la transcripción de una secuencia de ácido nucleico.

Naturalmente, puede ser importante emplear un promotor y/o potenciador que dirija eficazmente la expresión del segmento de ADN en el tipo celular u organismo elegido para la expresión. En general, los expertos en la materia de la biología molecular conocen el uso de promotores, potenciadores y combinaciones de tipos celulares para la expresión de proteínas (véase Sambrook *et al.*, 2001). Los promotores empleados pueden ser constitutivos, específicos de tejido o inducibles y pueden dirigir expresión de alto nivel del segmento de ADN introducido en condiciones específicas, tales como producción a gran escala de proteínas o péptidos recombinantes.

Se pueden emplear diversos elementos/promotores para regular la expresión de un gen. Los ejemplos de dichos elementos inducibles, que son regiones de una secuencia de ácido nucleico que pueden activarse en respuesta a un estímulo específico, incluyen la cadena pesada de inmunoglobulina (Banerji *et al.*, 1983; Gilles *et al.*, 1983; Grosschedl *et al.*, 1985; Atkinson *et al.*, 1986, 1987; Immler *et al.*, 1987; Weinberger *et al.*, 1984; Kiledjian *et al.*, 1988; Porton *et al.*, 1990), cadena ligera de inmunoglobulina (Queen *et al.*, 1983; Picard *et al.*, 1984), receptor de linfocitos T (Luria *et al.*, 1987; Winoto *et al.*, 1989; Redondo *et al.*, 1990), HLA DQ α y/o DQ β (Sullivan *et al.*, 1987), interferón β (Goodbourn *et al.*, 1986; Fujita *et al.*, 1987; Goodbourn *et al.*, 1988), interleucina-2 (Greene *et al.*, 1989), receptor de interleucina-2 (Greene *et al.*, 1989; Lin *et al.*, 1990), MHC de clase II 5 (Koch *et al.*, 1989), MHC de clase II HLA-DR α (Sherman *et al.*, 1989), β -actina (Kawamoto *et al.*, 1988; Ng *et al.*, 1989), creatina cinasa muscular (MCK) (Jaynes *et al.*, 1988; Horlick *et al.*, 1989; Johnson *et al.*, 1989), prealbúmina (transtiretina) (Costa *et al.*, 1988), elastasa I (Ornitz *et al.*, 1987), metalotioneína (MTII) (Karin *et al.*, 1987; Culotta *et al.*, 1989), colagenasa (Pinkert *et al.*, 1987; Angel *et al.*, 1987), albúmina (Pinkert *et al.*, 1987; Tronche *et al.*, 1989, 1990), α -fetoproteína (Godbout *et al.*, 1988; Campere *et al.*, 1989), γ -globina (Bodine *et al.*, 1987; Pérez-Stable *et al.*, 1990), β -globina (Trudel *et al.*, 1987), c-fos (Cohen *et al.*, 1987), c-Ha-Ras (Triesman, 1986; Deschamps *et al.*, 1985), insulina (Edlund *et al.*, 1985), molécula de adhesión de células neurales (NCAM) (Hirsh *et al.*, 1990), α 1-antitripaína (Latimer *et al.*, 1990), histona H2B (TH2B) (Hwang *et al.*, 1990), colágeno de ratón y/o de tipo I (Ripe *et al.*, 1989), proteínas reguladas por glucosa (GRP94 y GRP78) (Chang *et al.*, 1989), hormona del crecimiento de rata (Larsen *et al.*, 1986), amiloide A de suero humano (SAA) (Edbrooke *et al.*, 1989), troponina I (TN I) (Yutzey *et al.*, 1989), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Pech *et al.*, 1989), distrofia muscular de Duchenne (Klamut *et al.*, 1990), SV40 (Banerji *et al.*, 1981; Moreau *et al.*, 1981; Sleight *et al.*, 1985; Firak *et al.*, 1986; Herr *et al.*, 1986; Imbra *et al.*, 1986; Kadesch *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 1986; Ondek *et al.*, 1987; Kuhl *et al.*, 1987; Schaffner *et al.*, 1988), poliovirus (Swartzendruber *et al.*, 1975; Vasseur *et al.*, 1980; Katinka *et al.*, 1980, 1981; Tyndell *et al.*, 1981; Dandolo *et al.*, 1983; de Villiers *et al.*, 1984; Hen *et al.*, 1986; Satake *et al.*, 1988; Campbell *et al.*, 1988), retrovirus (Kriegler *et al.*, 1982, 1983; Levinson *et al.*, 1982; Kriegler *et al.*, 1983, 1984a, b, 1988; Bosze *et al.*, 1986; Miksicek *et al.*, 1986; Celander *et al.*, 1987; Thiesen *et al.*, 1988; Celander *et al.*, 1988; Choi *et al.*, 1988; Reisman *et al.*, 1989), virus del papiloma (Campo *et al.*, 1983; Lusky *et al.*, 1983; Spandidos y Wilkie, 1983; Spalholz *et al.*, 1985; Lusky *et al.*, 1986; Cripe *et al.*, 1987; Gloss *et al.*, 1987; Hirochika *et al.*, 1987; Stephens *et al.*, 1987), virus de la hepatitis B (Bulla *et al.*, 1986; Jameel *et al.*, 1986; Shaul *et al.*, 1987; Spandau *et al.*, 1988; Vannice *et al.*, 1988), virus de la inmunodeficiencia humana (Muesing *et al.*, 1987; Hauber *et al.*, 1988; Jakobovits *et al.*, 1988; Feng *et al.*, 1988; Takebe *et al.*, 1988; Rosen *et al.*, 1988; Berkhout *et al.*, 1989; Laspias *et al.*, 1989; Sharp *et al.*, 1989; Braddock *et al.*, 1989), citomegalovirus (CMV) IE (Weber *et al.*, 1984; Boshart *et al.*, 1985; Foecking *et al.*, 1986), virus de la leucemia del gibbon (Holbrook *et al.*, 1987; Quinn *et al.*, 1989).

Los elementos inducibles incluyen MT II - éster de forbol (TFA)/metales pesados (Palmiter *et al.*, 1982; Haslinger *et*

al., 1985; Searle *et al.*, 1985; Stuart *et al.*, 1985; Imagawa *et al.*, 1987; Karin *et al.*, 1987; Angel *et al.*, 1987b; McNeall *et al.*, 1989); MMTV (virus de tumor mamario de ratón) - glucocorticoides (Huang *et al.*, 1981; Lee *et al.*, 1981; Majors *et al.*, 1983; Chandler *et al.*, 1983; Lee *et al.*, 1984; Ponta *et al.*, 1985; Sakai *et al.*, 1988); interferón β - poli(rI)x/poli(rc) (Tavernier *et al.*, 1983); adenovirus 5 E2 - E1A (Imperiale *et al.*, 1984); collagenasa - éster de forbol (TPA) (Angel *et al.*, 1987a); estromelina - éster de forbol (TPA) (Angel *et al.*, 1987b); SV40 - éster de forbol (TPA) (Angel *et al.*, 1987b); gen MX murino - interferón, virus de la enfermedad de Newcastle (Hug *et al.*, 1988); gen GRP78 - A23187 (Resendez *et al.*, 1988); α -2-macroglobulina - IL-6 (Kunz *et al.*, 1989); vimentina - suero (Rittling *et al.*, 1989); gen H del MHC de clase I-2kb - interferón (Blonar *et al.*, 1989); HSP70 - antígeno T grande E1A/SV40 (Taylor *et al.*, 1989, 1990a, 1990b); proliferina - éster de forbol/TPA (Mordacq *et al.*, 1989); factor de necrosis tumoral - PMA (Hensel *et al.*, 1989); y gen α de hormona estimulante del tiroides - hormona tiroidea (Chatterjee *et al.*, 1989).

No se cree que el promotor particular que se emplea para controlar la expresión de polinucleótidos codificantes de péptidos o proteínas sea crítico, siempre que sea capaz de expresar el polinucleótido en una célula diana, preferentemente una célula bacteriana. Cuando la diana es una célula humana, es preferible situar la región codificante de polinucleótidos adyacente a y bajo el control de un promotor que sea capaz de expresarse en una célula humana. Hablando en general, dicho promotor podría incluir un promotor bacteriano, humano o vírico.

En los casos en que se administra un vector a un sujeto para la expresión de la proteína, se contempla que un promotor deseable para su uso con el vector sea uno que no esté regulado negativamente por citocinas o uno que sea lo suficientemente fuerte para que, incluso si está regulado negativamente, produzca una cantidad eficaz de al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes para inducir una respuesta inmunitaria. Son ejemplos de estos IE de CMV y LTR de VSR. Se pueden usar promotores específicos de tejido, en particular si la expresión está en células en las que es deseable la expresión de un antígeno, tales como una célula dendrítica o macrófagos. Los promotores de MHC I y MHC II de mamíferos son ejemplos de dichos promotores específicos de tejido.

2. Señales de inicio y sitios de unión a ribosomas internos (IRES)

También puede ser necesaria una señal de inicio específica para la traducción eficaz de secuencias codificantes. Estas señales incluyen el codón de inicio ATG o secuencias adyacentes. Puede ser necesario proporcionar señales de control de la traducción exógenas, incluyendo el codón de inicio ATG. Un experto habitual en la materia sería capaz de determinar esto y proporcionar las señales necesarias.

En una divulgación determinada, se utilizan elementos de los sitios internos de entrada al ribosoma (IRES) para crear mensajes multígenos o policistronicos. Los elementos IRES pueden evitar el modelo de exploración de ribosomas de la traducción dependiente de caperuza metilada $\square$ en 5' y comenzar la traducción en sitios internos (Pelletier y Sonenberg, 1988; Macejak y Sarnow, 1991). Los elementos IRES se pueden ligar a marcos abiertos de lectura heterólogos. Se pueden transcribir juntos múltiples marcos abiertos de lectura, cada uno separado por un IRES, creando mensajes policistronicos. Se pueden expresar múltiples genes de manera eficaz usando un único promotor/potenciador para transcribir un solo mensaje (véanse las patentes de los Estados Unidos n.º 5.925.565 y 5.935.819).

3. Marcadores seleccionables y detectables

En una divulgación determinada, pueden identificarse células que contienen una construcción de ácido nucleico *in vitro* o *in vivo* codificando un marcador seleccionable o detectable en el vector de expresión. Cuando se transcribe y se traduce, un marcador confiere un cambio identificable a la célula permitiendo una fácil identificación de células que contienen el vector de expresión. En general, un marcador seleccionable es uno que confiere una propiedad que permite la selección. Un marcador seleccionable positivo es uno en el que la presencia del marcador permite su selección, mientras que un marcador seleccionable negativo es uno en el que su presencia impide su selección. Un ejemplo de un marcador seleccionable positivo es un marcador de resistencia a fármacos.

B. Células hospedadoras

Como se usa en el presente documento, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" pueden usarse indistintamente. Todas estas expresiones también incluyen su descendencia, que es todas y cada una de las generaciones posteriores. Se entiende que toda la descendencia puede no ser idéntica debido a mutaciones deliberadas o involuntarias. En el contexto de la expresión de una secuencia de ácido nucleico heteróloga, "célula hospedadora" se refiere a una célula procariota o eucariota e incluye cualquier organismo transformable que sea capaz de replicar un vector o expresar un gen heterólogo codificado por un vector. Una célula hospedadora puede utilizarse, y se ha utilizado, como receptor de vectores o virus. Una célula hospedadora puede ser "transfectada" o "transformada", que se refiere a un proceso por el que el ácido nucleico exógeno, tal como una secuencia codificante de proteína recombinante, se transfiere o se introduce en la célula hospedadora. Una célula transformada incluye la célula objeto principal y su descendencia.

Pueden obtenerse células hospedadoras de procariotas o eucariotas, incluyendo bacterias, células de levadura, células de insecto y células de mamífero para la replicación del vector o la expresión de parte o la totalidad de la o

las secuencias de ácido nucleico. Numerosas líneas celulares y cultivos están disponibles para su uso como célula hospedadora y se pueden obtener a través de la colección americana de cultivos tipo (ATCC), que es una organización que actúa como un archivo para cultivos vivos y materiales genéticos (www.atcc.org).

5 C. Sistemas de expresión

Existen numerosos sistemas de expresión que comprenden al menos una parte o la totalidad de las composiciones analizadas anteriormente. Pueden emplearse sistemas basados en procariotas y/o eucariotas para producir secuencias de ácido nucleico o sus polipéptidos, proteínas y péptidos afines. Muchos de estos sistemas están disponibles en el mercado y de manera extendida.

El sistema de células de insecto/baculovirus puede producir un alto nivel de expresión de proteínas de un segmento de ácido nucleico heterólogo, tal como se describe en las patentes de los Estados Unidos 5.871.986 y 4.879.236, y que se pueden adquirir, por ejemplo, con el nombre MaxBac® 2.0 de Invitrogen® y sistema de expresión de baculovirus BacPack™ de Clontech®.

Además de los sistemas de expresión desvelados, otros ejemplos de sistemas de expresión incluyen el sistema de expresión de mamíferos inducible COMPLETE CONTROL™ de STRATAGENE®, que incluye un receptor sintético inducible por ecdisona, o su sistema de expresión de pET, un sistema de expresión de *E. coli*. Otro ejemplo de un sistema de expresión inducible está disponible en INVITROGEN®, que porta el sistema T-Rex™ (expresión regulada por tetraciclina), un sistema de expresión de mamífero inducible que utiliza el promotor de CMV de longitud completa. INVITROGEN® también proporciona un sistema de expresión de levadura denominado sistema de expresión de *Pichia methanolica*, que está diseñado para la producción a alto nivel de proteínas recombinantes en la levadura metilotrófica *Pichia methanolica*. Un experto en la materia sabría cómo expresar un vector, tal como una construcción de expresión, para producir una secuencia de ácido nucleico o su polipéptido, proteína o péptido afín.

III. POLISACÁRIDOS

Las composiciones inmunógenas de la invención pueden comprender además polisacáridos capsulares que incluyen uno o más de PIA (también conocido como PNAG) y/o polisacárido capsular de tipo V y/o tipo VIII de *S. aureus* y/o polisacárido capsular de tipo I y/o tipo II y/o tipo III de *S. epidermidis*.

A. PIA (PNAG)

Ahora está claro que las diversas formas de polisacáridos de superficie estafilocócicos identificados como PS/A, PIA y SAA son la misma entidad química: PNAG (Maira-Litran *et al.*, 2004). Por lo tanto, el término PIA o PNAG abarca todos estos polisacáridos u oligosacáridos derivados de ellos.

PIA es una adhesina intercelular de polisacárido y está compuesta de un polímero de glucosamina con enlaces β (1 $\rightarrow$ 6) sustituida con constituyentes de N-acetilo y O-succinilo. Este polisacárido está presente tanto en *S. aureus* como en *S. epidermidis* y puede aislarse de cualquier fuente (Joyce *et al.*, 2003; Maira-Litran *et al.*, 2002). Por ejemplo, PNAG puede aislarse de la cepa de *S. aureus* MN8m (documento WO04/43407). PIA aislado de *S. epidermidis* es un constituyente integral de la biopelícula. Es responsable de mediar en la adhesión célula-célula y probablemente también actúe para proteger la colonia en crecimiento de la respuesta inmunitaria del hospedador. Recientemente se ha mostrado que el polisacárido anteriormente conocido como poli-N-succinil- β -(1 $\rightarrow$ 6)-glucosamina (PNSG) no tiene la estructura esperada ya que la identificación de N-succinilación era incorrecta (Maira-Litran *et al.*, 2002). Por lo tanto, el término PIA también abarca el polisacárido conocido formalmente como PNSG y que ahora se ha descubierto que es PNAG.

PIA (o PNAG) puede ser de diferentes tamaños que varían de más de 400 kDa a entre 75 y 400 kDa a entre 10 y 75 kDa para oligosacáridos compuestos de hasta 30 unidades repetidas (de glucosamina con enlaces β -(1 $\rightarrow$ 6) sustituida con constituyentes de N-acetilo y O-succinilo). Se puede usar cualquier tamaño de polisacárido u oligosacárido PIA en una composición inmunógena de la invención, en un aspecto, el polisacárido tiene más de 40 kDa. Se puede lograr dimensionamiento mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, por microfluidificación, irradiación ultrasónica o por escisión química (documentos WO 03/53462, EP497524, EP497525). En determinados aspectos, PIA (PNAG) es al menos o como máximo 40-400 kDa, 40-300 kDa, 50-350 kDa, 60-300 kDa, 50-250 kDa y 60-200 kDa.

PIA (PNAG) puede tener diferentes grados de acetilación debido a la sustitución de los grupos amino por acetato. PIA producido *in vitro* está casi completamente sustituido en grupos amino (95-100 %). Como alternativa, se puede usar un PIA desacetilado (PNAG) que tenga menos de 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 % de acetilación. Se prefiere el uso de un PIA desacetilado (PNAG), ya que los epítopos no acetilados de PNAG son eficaces para mediar en la destrucción opsonica de bacterias grampositivas, preferentemente *S. aureus* y/o *S. epidermidis*. En determinados aspectos, el PIA (PNAG) tiene un tamaño entre 40 kDa y 300 kDa y está desacetilado de modo que menos del 60 %, 50 %, 40 %, 30 % o 20 % de los grupos amino están acetilados.

La expresión PNAG desacetilado (dPNAG) se refiere a un polisacárido u oligosacárido de PNAG en el que menos del 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 % o 10 % de los grupos amino están acetilados. En determinados aspectos, PNAG se desacetila para formar dPNAG tratando químicamente el polisacárido nativo. Por ejemplo, el PNAG nativo se trata con una solución básica de modo que el pH aumenta a más de 10. Por ejemplo, el PNAG se trata con NaOH, KOH o NH₄OH 0,1-5 M, 0,2-4 M, 0,3-3 M, 0,5-2 M, 0,75-1,5 M o 1 M. El tratamiento es durante al menos 10 a 30 minutos, o 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 o 20 horas a una temperatura de 20-100, 25-80, 30-60 o 30-50 o 35-45 °C. El dPNAG se puede preparar como se describe en el documento WO 04/43405.

El o los polisacáridos pueden conjugarse o no conjugarse con una proteína transportadora.

B. Polisacáridos de tipo 5 y tipo 8 de *S. aureus*

La mayoría de las cepas de *S. aureus* que provocan infección en el hombre contienen polisacáridos de tipo 5 o tipo 8. Aproximadamente 60 % de las cepas humanas son de tipo 8 y aproximadamente 30 % son de tipo 5. Las estructuras de los antígenos de polisacáridos capsulares de tipo 5 y tipo 8 se describen en Moreau *et al.*, (1990) y Fournier *et al.*, (1984). Ambos tienen FucNAc en su unidad de repetición, así como ManNAcA que puede utilizarse para introducir un grupo sulfhidrilo. Las estructuras son:

Tipo 5

→4)-β-D-ManNAcA(3OAc)-(1→4)-α-L-FucNAc(1→3)-β-D-FucNAc-(1→

Tipo 8

→3)-β-D-ManNAcA(4OAc)-(1→3)-β-D-FucNAc-(1→3)-β-D-FucNAc-(1→

Recientemente (Jones, 2005), la espectroscopia de RMN ha revisado las estructuras para:

Tipo 5

→4)-β-D-ManNAcA(1→4)-α-L-FucNAc(3OAc)-(1→3)-β-D-FucNAc-(1→

Tipo 8

→3)-β-D-ManNAcA(4OAc)-(1→3)-α-L-FucNAc(1→3)-α-D-FucNAc(1→

Se pueden extraer polisacáridos de la cepa adecuada de *S. aureus* utilizando un método bien conocido por los expertos en la materia, Véase patente de los Estados Unidos 6.294.177. Por ejemplo, ATCC 12902 es una cepa de *S. aureus* de tipo 5 y ATCC 12605 es una cepa de *S. aureus* de tipo 8.

Los polisacáridos son de tamaño nativo o, como alternativa, pueden dimensionarse, por ejemplo, mediante microfluidificación, irradiación ultrasónica o mediante tratamiento químico. La invención también abarca oligosacáridos derivados de los polisacáridos de tipo 5 y 8 de *S. aureus*. Los polisacáridos de tipo 5 y 8 incluidos en la composición inmunógena de la invención se conjugan preferentemente con una proteína transportadora como se describe a continuación o, como alternativa, no se conjugan. Las composiciones inmunógenas de la invención contienen como alternativa polisacárido de tipo 5 o de tipo 8.

C. Antígeno 336 de *S. aureus*

La composición inmunógena de la invención puede comprender el antígeno 336 de *S. aureus* descrito en la patente de los Estados Unidos 6.294.177. El antígeno 336 comprende hexosamina con enlaces β, no contiene grupos O-acetilo y se une específicamente con anticuerpos contra *S. aureus* tipo 336 depositados en ATCC 55804. El antígeno 336 puede ser un polisacárido que es de tamaño nativo o, como alternativa, puede dimensionarse, por ejemplo, mediante microfluidificación, irradiación ultrasónica o mediante tratamiento químico. La invención también abarca oligosacáridos derivados del antígeno 336. El antígeno 336 puede estar conjugado o no con una proteína transportadora.

D. Polisacáridos de tipo I, II y III de *S. epidermidis*

Entre los problemas asociados con el uso de polisacáridos en la vacunación, está el hecho de que los polisacáridos en sí mismos son malos inmunógenos. Se prefiere que los polisacáridos estén unidos a un vehículo proteico que proporciona ayuda de linfocitos T espectadores para mejorar la inmunogenicidad.

Los ejemplos de dichos vehículos que pueden conjugarse con inmunógenos de polisacáridos incluyen los toxoides de la difteria y el tétanos (DT, DT CRM197 y TT respectivamente), hemocianina de lapa californiana (KLH) y el derivado proteico purificado de la tuberculina (PPD), exoproteína A de *Pseudomonas aeruginosa* (rEPA), proteína D de *Haemophilus influenzae*, neumolisina o fragmentos de cualquiera de los anteriores. Los fragmentos adecuados para su uso incluyen fragmentos que abarcan epítomos T auxiliares. En particular, el fragmento de proteína D de *H. influenzae* contendrá preferentemente el tercio N-terminal de la proteína. La proteína D es una proteína de unión a IgD de *Haemophilus influenzae* (documento EP 0 594 610 B1) y es un inmunógeno potencial. Además, se pueden

usar proteínas estafilocócicas como una proteína transportadora en los conjugados de polisacáridos.

Una proteína transportadora que sería particularmente ventajosa para usar en el contexto de una vacuna estafilocócica es el toxoide alfa estafilocócico. La forma nativa puede conjugarse con un polisacárido ya que el proceso de conjugación reduce la toxicidad. Preferentemente, se utilizan toxinas alfa destoxificadas genéticamente tales como las variantes His35Leu o His35Arg como vehículos, ya que la toxicidad residual es menor. Como alternativa, la toxina alfa se destoxifica químicamente mediante tratamiento con un reactivo de reticulación, formaldehído o glutaraldehído. Una toxina alfa destoxificada genéticamente opcionalmente se destoxifica químicamente, preferentemente mediante tratamiento con un reactivo de reticulación, formaldehído o glutaraldehído para reducir adicionalmente la toxicidad.

Los polisacáridos se pueden unir a la proteína o proteínas transportadoras por cualquier método conocido (por ejemplo, los métodos descritos en las patentes de los Estados Unidos n.º 4.372.945, 4.474.757 y 4.356.170). Preferentemente, se lleva a cabo química de conjugación de CDAP (véase el documento WO95/08348). En CDAP, se utiliza preferentemente el reactivo de cianilación tetrafluoroborato de 1-ciano-dimetilaminopiridinio (CDAP) para la síntesis de conjugados de polisacárido-proteína. La reacción de cianilación se puede realizar en condiciones relativamente suaves, lo que evita la hidrólisis de los polisacáridos sensibles a alcalinidad. Esta síntesis permite el acoplamiento directo a una proteína transportadora.

La conjugación implica preferentemente producir un enlace directo entre la proteína transportadora y el polisacárido. Opcionalmente, se puede introducir un espaciador (tal como dihidruro adípico (ADH)) entre la proteína transportadora y el polisacárido.

IV. RESPUESTA Y ENSAYOS INMUNITARIOS

Como se ha analizado anteriormente, la invención se refiere a evocar o inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto contra una coagulasa o uno o más dominios 1-2 de coagulasa o variantes de los mismos. En una realización, la respuesta inmunitaria puede proteger contra o tratar a un sujeto que tiene, se sospecha que tiene o está en riesgo de desarrollar una infección o enfermedad relacionada, en particular, las relacionadas con estafilococos. Un uso de las composiciones inmunógenas de la invención es prevenir infecciones nosocomiales mediante la inoculación de un sujeto antes de someterse a procedimientos en un hospital u otro entorno que tenga un mayor riesgo de infección.

A. Inmunoensayos

La presente divulgación incluye la implementación de ensayos serológicos para evaluar si las composiciones de la invención inducen o provocan una respuesta inmunitaria y en qué medida. Existen muchos tipos de inmunoensayos que se pueden implementar. Los inmunoensayos abarcados por la presente divulgación incluyen los descritos en la patente de los Estados Unidos 4.367.110 (ensayo doble de anticuerpos monoclonales de tipo sándwich) y patente de los Estados Unidos 4.452.901 (transferencia de western). Otros ensayos incluyen inmunoprecipitación de ligandos marcados e inmunocitoquímica, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Los inmunoensayos son en general ensayos de unión. Determinados inmunoensayos preferidos son los diversos tipos de ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) y radioinmunoensayos (RIA) conocidos en la técnica. La detección inmunohistoquímica con el uso de secciones tisulares también es particularmente útil. En un ejemplo, los anticuerpos o antígenos se inmovilizan en una superficie seleccionada, tal como un pocillo en una placa de microtitulación de poliestireno, tira reactiva o soporte de columna. Después, se añade a los pocillos una composición de prueba que se sospecha que contiene el antígeno o anticuerpo deseado, tal como una muestra clínica. Después de unir y lavar para eliminar los complejos inmunitarios unidos de manera inespecífica, se puede detectar el antígeno o anticuerpo unido. En general, se logra detección mediante la adición de otro anticuerpo, específico para el antígeno o anticuerpo deseado, que está ligado a un marcador detectable. Este tipo de ELISA se conoce como "ELISA de tipo sándwich". También se puede lograr detección mediante la adición de un segundo anticuerpo específico para el antígeno deseado, seguido de la adición de un tercer anticuerpo que tenga afinidad de unión por el segundo anticuerpo, estando el tercer anticuerpo ligado a un marcador detectable.

Los ELISA de competición también son posibles implementaciones en las que las muestras de prueba compiten por unirse con cantidades conocidas de antígenos o anticuerpos marcados. La cantidad de especies reactivas en la muestra desconocida se determina mezclando la muestra con las especies marcadas conocidas antes o durante la incubación con pocillos recubiertos. La presencia de especies reactivas en la muestra actúa para reducir la cantidad de especies marcadas disponibles para unirse al pocillo y, por tanto, reduce la señal final. Independientemente del formato empleado, los ELISA tienen determinadas características en común, tales como el recubrimiento, la incubación o la unión, el lavado para eliminar especies unidas de manera inespecífica y detección de los complejos inmunitarios unidos.

El antígeno o los anticuerpos también pueden estar ligados a un soporte sólido, tal como en forma de placa, perlas, tira reactiva, membrana o matriz de columna, y la muestra para analizar se aplica al antígeno o anticuerpo inmovilizado. Al recubrir una placa con antígeno o anticuerpo, en general se incuban los pocillos de la placa con una

solución del antígeno o anticuerpo, ya sea durante una noche o durante un periodo específico. Los pocillos de la placa se lavarán después para eliminar el material adsorbido de manera incompleta. Cualquier superficie disponible restante de los pocillos se "recubre" después con una proteína inespecífica que es antigénicamente neutra con respecto a los antisueros de prueba. Estos incluyen seroalbúmina bovina (BSA), caseína y soluciones de leche en polvo. El recubrimiento permite el bloqueo de sitios de adsorción inespecíficos en la superficie de inmovilización y, por tanto, reduce la actividad de fondo provocada por la unión inespecífica de antisueros a la superficie.

B. Diagnóstico de infección bacteriana

Además del uso de proteínas, polipéptidos y/o péptidos, así como anticuerpos que se unen a estos polipéptidos, proteínas y/o péptidos, para tratar o prevenir la infección como se ha descrito anteriormente, la presente divulgación contempla el uso de estos polipéptidos, proteínas, péptidos y/o anticuerpos de diversas maneras, incluyendo la detección de la presencia de estafilococos para diagnosticar una infección, ya sea en un paciente o en un equipo médico que también puede infectarse. De acuerdo con la divulgación, un método preferido para detectar la presencia de infecciones implica las etapas de obtener una muestra que se sospecha que está infectada por una o más especies o cepas de bacterias estafilocócicas, tal como una muestra tomada de un individuo, por ejemplo, de la sangre, saliva, tejidos, hueso, músculo, cartílago o piel de uno. Tras el aislamiento de la muestra, pueden llevarse a cabo ensayos de diagnóstico que utilizan los polipéptidos, proteínas, péptidos y/o anticuerpos para detectar la presencia de estafilococos y dichas técnicas de ensayo para determinar dicha presencia en una muestra son bien conocidas por los expertos en la materia e incluyen métodos tales como radioinmunoensayo, análisis de transferencia de Western y ensayos ELISA. En general, se contempla un método para diagnosticar una infección en donde a una muestra que se sospecha que está infectada con estafilococos se le ha añadido el polipéptido, proteína, péptido, anticuerpo o anticuerpo monoclonal y los estafilococos están indicados por la unión del anticuerpo a los polipéptidos, proteínas y/o péptidos, o polipéptidos, proteínas y/o péptidos que se unen con los anticuerpos en la muestra.

En consecuencia, pueden utilizarse anticuerpos para la prevención de la infección por bacterias estafilocócicas (es decir, inmunización pasiva), para el tratamiento de una infección en curso o para su uso como herramientas de investigación. El término "anticuerpos" como se usa en el presente documento incluye anticuerpos monoclonales, policlonales, quiméricos, monocatenarios, biespecíficos, simianizados y humanizados o primatizados, así como fragmentos Fab, tales como los fragmentos que mantienen la especificidad de unión de los anticuerpos, incluyendo los productos de una biblioteca de expresión de inmunoglobulina Fab. En consecuencia, la divulgación contempla el uso de cadenas individuales tales como las cadenas pesadas y ligeras variables de los anticuerpos. La generación de cualquiera de estos tipos de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos es bien conocida por los expertos en la materia. Se pueden encontrar ejemplos específicos de la generación de un anticuerpo contra una proteína bacteriana en la publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos n.º 20030153022.

Cualquiera de los polipéptidos, proteínas, péptidos y/o anticuerpos descritos anteriormente pueden marcarse directamente con un marcador detectable para la identificación y cuantificación de bacterias estafilocócicas. Los marcadores para su uso en inmunoensayos son generalmente conocidos por los expertos en la materia e incluyen enzimas, radioisótopos y sustancias fluorescentes, luminiscentes y cromógenas, incluyendo partículas de colores tales como oro coloidal o perlas de látex. Los inmunoensayos adecuados incluyen ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA).

C. Inmunidad protectora

Las composiciones proteicas pueden conferir inmunidad protectora a un sujeto. La inmunidad protectora se refiere a la capacidad del cuerpo para montar una respuesta inmunitaria específica que protege al sujeto de desarrollar una enfermedad o afección en particular que implique al agente contra el que hay una respuesta inmunitaria. Una cantidad inmunogénicamente eficaz es capaz de conferir inmunidad protectora al sujeto.

Como se usa en el presente documento en la memoria descriptiva y en la sección de reivindicaciones a continuación, el término polipéptido o péptido se refiere a un tramo de aminoácidos unidos covalentemente entre sí a través de enlaces peptídicos. Diferentes polipéptidos tienen diferentes funcionalidades según la presente invención. Aunque según un aspecto, un polipéptido se obtiene de un inmunógeno diseñado para inducir una respuesta inmunitaria activa en un receptor, según otro aspecto, un polipéptido se obtiene de un anticuerpo que resulta después de la inducción de una respuesta inmunitaria activa en, por ejemplo, un animal, y que puede servir para inducir una respuesta inmunitaria pasiva en el receptor. En ambos casos, sin embargo, el polipéptido está codificado por un polinucleótido según cualquier posible uso codónico.

Como se usa en el presente documento, la expresión "respuesta inmunitaria" o su equivalente "respuesta inmunológica" se refiere al desarrollo de una respuesta humoral (mediada por anticuerpos), celular (mediada por linfocitos T específicos de antígeno o sus productos de secreción) o tanto humoral como celular dirigida contra una proteína, péptido, carbohidrato o polipéptido en un paciente receptor. Dicha respuesta puede ser una respuesta activa inducida por la administración de inmunógeno o una respuesta pasiva inducida por la administración de un anticuerpo, material que contiene anticuerpos o linfocitos T sensibilizados. La presentación de epítopos

polipeptídicos en asociación con moléculas del MHC de clase I o clase II induce una respuesta inmunitaria celular, para activar linfocitos T auxiliares CD4 (+) específicos de antígeno y/o linfocitos T citotóxicos CD8 (+). La respuesta también puede implicar la activación de monocitos, macrófagos, linfocitos NK, basófilos, células dendríticas, astrocitos, células de la microglía, eosinófilos u otros componentes de la inmunidad innata. Como se usa en el presente documento, la "inmunidad activa" se refiere a cualquier inmunidad conferida a un sujeto mediante la administración de un antígeno.

Como se usa en el presente documento, la "inmunidad pasiva" se refiere a cualquier inmunidad conferida a un sujeto sin administración de un antígeno al sujeto. Por lo tanto, la "inmunidad pasiva" incluye la administración de efectores inmunitarios activados que incluyen mediadores celulares o mediadores de proteínas (p. ej., anticuerpos monoclonales y/o policlonales) de una respuesta inmunitaria. Se puede usar una composición de anticuerpo monoclonal o policlonal en la inmunización pasiva para la prevención o el tratamiento de la infección por organismos que portan el antígeno reconocido por el anticuerpo. Una composición de anticuerpos puede incluir anticuerpos que se unen a diversos antígenos que a su vez pueden estar asociados con diversos organismos. El componente de anticuerpo puede ser un antisuero policlonal. En determinados aspectos, el anticuerpo o anticuerpos se purifican por afinidad a partir de un animal o segundo sujeto que se ha expuesto a un antígeno o antígenos. Como alternativa, se puede usar una mezcla de anticuerpos, que es una mezcla de anticuerpos monoclonales y/o policlonales contra antígenos presentes en microbios u organismos iguales, relacionados o diferentes, tales como bacterias grampositivas, bacterias gramnegativas, incluyendo bacterias estafilococos.

Se puede transmitir inmunidad pasiva a un paciente o sujeto mediante la administración al paciente de inmunoglobulinas (Ig) y/u otros factores inmunitarios obtenidos de un donante u otra fuente distinta de paciente que tenga una inmunorreactividad conocida. En otros aspectos, una composición antigénica de la presente invención se puede administrar a un sujeto que después actúa como fuente o donante de globulina, producida en respuesta a la exposición con la composición antigénica ("globulina hiperinmunitaria"), que contiene anticuerpos dirigidos contra *Staphylococcus* u otro organismo. Un sujeto tratado de este modo donaría plasma del que después se obtendría globulina hiperinmunitaria, mediante metodología convencional de fraccionamiento de plasma, y que se administraría a otro sujeto para transmitir resistencia contra o tratar la infección por estafilococos. Las globulinas hiperinmunitarias son particularmente útiles para individuos inmunodeprimidos, para individuos que se someten a procedimientos invasivos o donde el tiempo no permite que el individuo produzca sus propios anticuerpos en respuesta a la vacunación. Véase patentes de los Estados Unidos 6.936.258, 6.770.278, 6.756.361, 5.548.066, 5.512.282, 4.338.298 y 4.748.018 para métodos y composiciones ilustrativos relacionados con la inmunidad pasiva.

Para los fines de la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las expresiones "epítipo" y "determinante antigénico" se usan indistintamente para hacer referencia a un sitio en un antígeno al que los términos B y/o T responden o reconocen. Los epítipos de linfocitos B pueden formarse tanto a partir de aminoácidos contiguos como a partir de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos mediante el plegamiento terciario de una proteína. Los epítipos formados a partir de aminoácidos contiguos normalmente están conservados frente a la exposición a disolventes desnaturizantes mientras que los epítipos formados por plegamiento terciario normalmente se pierden tras el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítipo incluye normalmente al menos 3 y, más habitualmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de los epítipos incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos x y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, p. ej., Epitope Mapping Protocols (1996). Pueden identificarse anticuerpos que reconocen el mismo epítipo en un inmunoensayo sencillo que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana. Los linfocitos T reconocen epítipos continuos de aproximadamente nueve aminoácidos para células CD8 o aproximadamente 13-15 aminoácidos para células CD4. Los linfocitos T que reconocen el epítipo pueden identificarse mediante ensayos *in vitro* que miden la proliferación dependiente de antígeno, según lo determinado mediante incorporación de ³H-timidina por linfocitos T sensibilizados en respuesta a un epítipo (Burke *et al.*, 1994), mediante destrucción dependiente de antígeno (ensayo de linfocitos T citotóxicos, Tigges *et al.*, 1996) o mediante secreción de citocinas.

La presencia de una respuesta inmunológica mediada por células se puede determinar mediante ensayos de proliferación (linfocitos T CD4 (+)) o ensayos de CTL (linfocitos T citotóxicos). Las contribuciones relativas de las respuestas humores y celulares al efecto protector o terapéutico de un inmunógeno se pueden distinguir aislando por separado IgG y linfocitos T de un animal singénico inmunizado y midiendo el efecto protector o terapéutico en un segundo sujeto.

Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones, los términos "anticuerpo" o "inmunoglobulina" se usan indistintamente y se refieren a cualquiera de varias clases de proteínas relacionadas estructuralmente que actúan como parte de la respuesta inmunitaria de un animal o receptor, proteínas que incluyen IgG, IgD, IgE, IgA, IgM y proteínas relacionadas.

En condiciones fisiológicas normales, se encuentran anticuerpos en el plasma y otros líquidos corporales y en la membrana de determinadas células y son producidos por linfocitos del tipo denominado linfocitos B o su equivalente funcional. Los anticuerpos de la clase IgG están compuestos por cuatro cadenas polipeptídicas unidas entre sí por enlaces disulfuro. Las cuatro cadenas de moléculas de IgG intactas son dos cadenas pesadas idénticas

denominadas cadenas H y dos cadenas ligeras idénticas denominadas cadenas L.

Para producir anticuerpos policlonales, un hospedador, tal como un conejo o una cabra, se inmuniza con el antígeno o fragmento de antígeno, en general con un adyuvante y, si es necesario, acoplado a un vehículo. Se recogen posteriormente anticuerpos contra el antígeno de los sueros del hospedador. El anticuerpo policlonal puede purificarse por afinidad contra el antígeno haciéndolo mono-específico.

Se pueden producir anticuerpos monoclonales mediante hiperinmunización de un donante adecuado con el antígeno o *ex vivo* mediante el uso de cultivos primarios de células esplénicas o líneas celulares procedentes del bazo (Anavi, 1998; Huston *et al.*, 1991; Johnson *et al.*, 1991; Mernaugh *et al.*, 1995).

Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones, la expresión "una parte inmunológica de un anticuerpo" incluye un fragmento Fab de un anticuerpo, un fragmento Fv de un anticuerpo, una cadena pesada de un anticuerpo, una cadena ligera de un anticuerpo, un heterodímero que consiste en una cadena pesada y una cadena ligera de un anticuerpo, un fragmento variable de una cadena ligera de un anticuerpo, un fragmento variable de una cadena pesada de un anticuerpo y una variante de cadena sencilla de un anticuerpo, que también se conoce como scFv. Además, el término incluye inmunoglobulinas quiméricas que son los productos de expresión de genes fusionados procedentes de diferentes especies, una de las especies puede ser un ser humano, en cuyo caso se dice que una inmunoglobulina quimérica está humanizada. Normalmente, una parte inmunológica de un anticuerpo compete con el anticuerpo intacto del que se obtuvo por la unión específica a un antígeno.

Opcionalmente, un anticuerpo o preferentemente una parte inmunológica de un anticuerpo, puede conjugarse químicamente, o expresarse como, una proteína de fusión con otras proteínas. Para los fines de la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, todas estas proteínas fusionadas se incluyen en la definición de anticuerpos o una parte inmunológica de un anticuerpo.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "agente inmunógeno" o "inmunógeno" o "antígeno" se usan indistintamente para describir una molécula capaz de inducir una respuesta inmunológica contra sí misma tras su administración a un receptor, ya sea sola, junto con un adyuvante o presentada en un vehículo de presentación.

D. Métodos de tratamiento

Un método de la presente divulgación incluye el tratamiento de una enfermedad o afección provocada por un patógeno estafilococo. Se puede administrar un polipéptido inmunógeno para inducir una respuesta inmunitaria en una persona infectada con estafilococo o que se sospecha que ha estado expuesta a estafilococo. Se pueden emplear métodos con respecto a individuos que han dado resultado positivo para exposición al estafilococo o que se consideran en riesgo de infección en función de una posible exposición. La presente invención se refiere a una cantidad eficaz de una composición de la invención para su uso en un método para tratar o prevenir una infección estafilocócica en un sujeto. En una realización preferida, el sujeto se trata en función de una prueba que indica infección estafilocócica.

En particular, se desvela un método de tratamiento para la infección estafilocócica, en particular, infecciones nosocomiales adquiridas en el hospital. Las composiciones inmunógenas y las vacunas de la invención son particularmente ventajosas para usar en casos de cirugía programada. Dichos pacientes conocerán la fecha de la cirugía por adelantado y podrían ser inoculados con anticipación. Las composiciones inmunógenas y las vacunas de la invención también son ventajosas para usar para inocular a profesionales sanitarios.

En algunas realizaciones de la composición inmunogénica para su uso, el tratamiento se administra en presencia de adyuvantes o vehículos u otros antígenos estafilocócicos. Asimismo, en algunos ejemplos, el tratamiento comprende la administración de otros agentes utilizados habitualmente contra la infección bacteriana, tales como uno o más antibióticos.

El uso de péptidos para la vacunación puede requerir, aunque no necesariamente, la conjugación del péptido con una proteína transportadora inmunógena, tal como el antígeno de superficie de la hepatitis B, hemocianina de lapa californiana o seroalbúmina bovina. Se conocen bien en la técnica métodos para realizar esta conjugación.

V. VACUNA Y OTRAS COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS Y ADMINISTRACIÓN

A. Vacunas

La presente invención incluye métodos para prevenir o aliviar infecciones estafilocócicas, en particular infecciones nosocomiales adquiridas en el hospital. La presente invención se refiere a una cantidad eficaz de una composición de la invención para su uso en un método para tratar o prevenir una infección estafilocócica en un sujeto. Como tal, la invención contempla vacunas para su uso en realizaciones de inmunización tanto activa como pasiva. Las composiciones inmunógenas, que se ha propuesto que son adecuadas para su uso como vacuna, pueden prepararse a partir de coagulasas inmunógenas o un fragmento de las mismas o una variante de las mismas como

se especifica en las reivindicaciones. Las coagulasas, un fragmento de las mismas o una variante de las mismas, pueden usarse en combinación con otras proteínas de virulencia secretadas, proteínas de superficie o fragmentos inmunógenos de las mismas. En determinados aspectos, el material antigénico se dializa ampliamente para eliminar las moléculas de pequeño peso molecular no deseadas y/o se liofiliza para una formulación más fácil en un vehículo deseado.

Otras opciones para una vacuna basada en proteínas/péptidos implican la introducción de ácidos nucleicos que codifican el o los antígenos como vacunas de ADN. A este respecto, informes recientes han descrito la construcción de virus vaccinia recombinantes que expresan 10 epítomos contiguos mínimos de CTL (Thomson, 1996) o una combinación de epítomos de linfocitos B, linfocitos T citotóxicos (CTL) y T auxiliares (Th) de varios microbios (An, 1997), y el uso exitoso de dichas construcciones para inmunizar ratones para preparar respuestas inmunitarias protectoras. Por tanto, existen abundantes pruebas en la bibliografía para la utilización exitosa de péptidos, células presentadoras de antígenos (APC) con pulsos de péptidos y construcciones que codifican péptidos para una sensibilización *in vivo* eficaz de las respuestas inmunitarias protectoras. El uso de secuencias de ácido nucleico como vacunas se ilustra en las patentes de los Estados Unidos 5.958.895 y 5.620.896.

La preparación de vacunas que contienen secuencia o secuencias de polipéptidos o péptidos como principios activos generalmente se entiende bien en la técnica, como se ilustra en las patentes de los Estados Unidos 4.608.251; 4.601.903; 4.599.231; 4.599.230; 4.596.792; y 4.578.770. Normalmente, dichas vacunas se preparan como inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas: también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquido, antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse. El principio activo inmunógeno se mezcla con frecuencia con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el principio activo. Son excipientes adecuados, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la vacuna puede contener cantidades de sustancias adyuvantes tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes del pH o adyuvantes que mejoran la eficacia de las vacunas. En realizaciones específicas, las vacunas se formulan con una combinación de sustancias, como se describe en las patentes de los Estados Unidos 6.793.923 y 6.733.754.

Las vacunas pueden administrarse convencionalmente por vía parenteral, mediante inyección, por ejemplo, por vía subcutánea o por vía intramuscular. Las formulaciones adicionales que son adecuadas para otros modos de administración incluyen supositorios y, en algunos casos, formulaciones orales. Para los supositorios, los aglutinantes y vehículos tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos: dichos supositorios se pueden formar a partir de mezclas que contienen el principio activo en el intervalo de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 10 %, preferentemente de aproximadamente 1 % a aproximadamente 2 %. Las formulaciones orales incluyen excipientes normalmente empleados tales como, por ejemplo, usos farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio y similares. Estas composiciones adoptan la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen de aproximadamente 10 % a aproximadamente 95 % de principio activo, preferentemente de aproximadamente 25 % a aproximadamente 70 %.

Los polipéptidos y las construcciones de ADN codificantes de polipéptidos pueden formularse en una vacuna como formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácidos (formadas con los grupos amino libres del péptido) y las que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares.

Normalmente, las vacunas se administran de manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz e inmunógena. La cantidad para administrar depende del sujeto que se va a tratar, incluyendo la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpos y el grado de protección deseado. Las cantidades precisas de principio activo que es necesario administrar dependen del criterio del facultativo. Sin embargo, los intervalos de dosificación adecuados son del orden de varios cientos de microgramos de principio activo por vacunación. Los regímenes adecuados para la administración inicial y las dosis de refuerzo también son variables, pero se tipifican por una administración inicial seguida de inoculaciones posteriores u otras administraciones.

La forma de aplicación puede variar ampliamente. Se puede utilizar cualquiera de los métodos convencionales para la administración de una vacuna. Se cree que estos incluyen la aplicación oral dentro de una base sólida fisiológicamente aceptable o en una dispersión fisiológicamente aceptable, por vía parenteral, por inyección y similares. La dosificación de la vacuna dependerá de la vía de administración y variará según el tamaño y la salud del sujeto.

En determinados casos, será deseable tener múltiples administraciones de la vacuna, p. ej., 2, 3, 4, 5, 6 o más administraciones. Las vacunas pueden ser a intervalos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 a 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 semanas, incluyendo todos los intervalos entre ellos. Los refuerzos periódicos a intervalos de 1-5 años serán deseables para mantener los niveles protectores de los anticuerpos. La evolución de la inmunización puede seguirse mediante ensayos de anticuerpos contra los antígenos, como se describe en las patentes de los Estados Unidos 3.791.932;

4.174.384 y 3.949.064.

1. Vehículos

- 5 Una composición dada puede variar en su inmunogenicidad. Por lo tanto, es con frecuencia necesario reforzar el sistema inmunitario del hospedador, como se puede lograr mediante el acoplamiento de un péptido o polipéptido a un vehículo. Son vehículos ilustrativos y preferidos la hemocianina de lapa californiana (KLH) y la seroalbúmina bovina (BSA). También se pueden usar otras albúminas tales como ovoalbúmina, seroalbúmina de ratón o seroalbúmina de conejo como vehículos. Se conocen bien en la técnica medios para conjugar un polipéptido con una proteína transportadora e incluyen glutaraldehído, éster de *m*-maleimidobencoil-*N*-hidroxisuccinimida, carbodiimida y bencidina bis-biazotizada.

2. Adyuvantes

- 15 La inmunogenicidad de composiciones de polipéptidos o péptidos se puede mejorar mediante el uso de estimulantes inespecíficos de la respuesta inmunitaria, conocidos como adyuvantes. Los adyuvantes adecuados incluyen todos los compuestos inmunoestimulantes aceptables, tales como citocinas, toxinas o composiciones sintéticas. Se pueden usar varios adyuvantes para mejorar la respuesta de anticuerpos contra una coagulasa y/o su variante, tales como uno o más dominios 1-2 de coagulasa, o cualquier otra proteína bacteriana o combinación contemplada en el presente documento. Los adyuvantes pueden (1) inmovilizar el antígeno en el cuerpo para provocar una liberación lenta; (2) atraer células implicadas en la respuesta inmunitaria al sitio de administración; (3) inducir la proliferación o activación de células del sistema inmunitario; o (4) mejorar la propagación del antígeno por todo el cuerpo del sujeto.

- 25 Los adyuvantes incluyen emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite, sales minerales, polinucleótidos y sustancias naturales. Los adyuvantes específicos que pueden usarse incluyen IL-1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, interferón γ , GM-CSF, BCG, sales de aluminio, tales como hidróxido de aluminio u otro compuesto de aluminio, compuestos de MDP, tales como thur-MDP y nor-MDP, CGP (MTP-PE), lípido A y monofosforil lípido A (MPL). RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, MPL, dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS) en una emulsión de escualeno/Tween 80 al 2 %. Se pueden usar incluso antígenos del MHC. Otros adyuvantes o métodos se ilustran en las patentes de los Estados Unidos 6.814.971, 5.084.269, 6.656.462).

- 35 Diversos métodos para lograr el efecto adyuvante de la vacuna incluyen el uso de agentes tales como hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio (alumbre), utilizados habitualmente como una solución de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,1 % en solución salina tamponada con fosfato, mezcla con polímeros sintéticos de azúcares (Carbopol®) utilizados como una solución de aproximadamente 0,25 %, agregación de la proteína en la vacuna mediante tratamiento térmico con temperaturas que varían entre aproximadamente 70 ° y aproximadamente 101 °C durante un periodo de 30 segundos a 2 minutos, respectivamente. Para producir un efecto adyuvante, también puede emplearse agregación mediante reactivación con anticuerpos (Fab) tratados con pepsina contra la albúmina; una mezcla con células bacterianas (p. ej., *C. parvum*), componentes de endotoxinas o lipopolisacáridos de bacterias gramnegativas; una emulsión en vehículos oleaginosos fisiológicamente aceptables (p. ej., mono-oleato de manida (Aracel A)); o una emulsión con una solución al 20 % de un perfluorocarburo (Fluosol-DA®) utilizada como sustituto en bloque.

- 45 Los adyuvantes ilustrativos y, con frecuencia, preferidos incluyen adyuvante completo de Freund (un estimulante inespecífico de la respuesta inmunitaria que contiene *Mycobacterium tuberculosis* muerta), adyuvantes incompletos de Freund e hidróxido de aluminio.

- 50 En algunos aspectos, se prefiere que el adyuvante se seleccione para ser un inductor preferencial de un tipo de respuesta Th1 o Th2. Niveles altos de citocinas de tipo Th1 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunitarias mediadas por células a un antígeno dado, mientras que niveles altos de citocinas de tipo Th2 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunitarias humorales al antígeno.

- 55 La distinción de la respuesta inmunitaria de tipo Th1 y Th2 no es absoluta. En realidad, un individuo apoyará una respuesta inmunitaria que se describe como predominantemente Th1 o predominantemente Th2. Sin embargo, con frecuencia es conveniente considerar las familias de citocinas con respecto a lo descrito en clones de linfocitos T CD4+ murinas por Mosmann y Coffman (Mosmann y Coffman, 1989). Tradicionalmente, las respuestas de tipo Th1 están asociadas con la producción de las citocinas INF- γ e IL-2 por linfocitos T. Otras citocinas con frecuencia directamente asociadas con la inducción de respuestas inmunitarias de tipo Th1 no son producidas por linfocitos T, tales como IL-12. Por el contrario, las respuestas de tipo Th2 están asociadas con la secreción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10.

- 65 Además de los adyuvantes, puede ser deseable administrar conjuntamente modificadores de la respuesta biológica (BRM) para mejorar las respuestas inmunitarias. Se ha mostrado que los BRM regulan positivamente la inmunidad de linfocitos T o regulan negativamente la actividad de células supresoras. Dichos BRM incluyen cimetidina (CIM; 1200 mg/d) (Smith/Kline, PA); o dosis bajas de ciclofosfamida (CYP; 300 mg/m²) (Johnson/Mead, NJ) y citocinas tales como interferón γ , IL-2 o IL-12 o genes que codifican proteínas implicadas en funciones inmunitarias auxiliares,

tales como B-7.

B. Componentes y restos lipídicos

En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden uno o más lípidos asociados con un ácido nucleico o un polipéptido/péptido. Un lípido es una sustancia que es insoluble en agua y extraíble con un disolvente orgánico. Un experto en la materia entiende los compuestos distintos de los descritos específicamente en el presente documento como lípidos y estos están abarcados por las composiciones de la presente invención. Un componente lipídico y uno no lipídico pueden estar unidos entre sí, de manera covalente o no covalente.

Un lípido puede ser un lípido de origen natural o un lípido sintético. Sin embargo, un lípido es habitualmente una sustancia biológica. Se conocen bien en la técnica lípidos biológicos e incluyen, por ejemplo, grasas neutras, fosfolípidos, fosfoglicéridos, esteroides, terpenos, lisolípidos, glucoesfingolípidos, glucolípidos, sulfatidas, lípidos con éter y ácidos grasos con enlaces de éster y lípidos polimerizables, y combinaciones de los mismos.

Una molécula de ácido nucleico o un polipéptido/péptido, asociado con un lípido, puede dispersarse en una solución que contenga un lípido, disolverse con un lípido, emulsionarse con un lípido, mezclarse con un lípido, combinarse con un lípido, unirse covalentemente a un lípido, estar contenido como una suspensión en un lípido o asociado de otra manera con un lípido. Una composición asociada a lípidos o poxvirus-lípidos no está limitada a ninguna estructura en particular. Por ejemplo, también puede estar simplemente intercalada en una solución, posiblemente formando agregados que no son uniformes en cuanto a su tamaño o forma. En otro ejemplo, pueden estar presente en una estructura de bicapa, como micelas, o con una estructura "colapsada". En otro ejemplo, también se contempla un complejo de lipofectamina (Gibco BRL)-poxvirus o Superfect (Qiagen)-poxvirus.

En determinadas realizaciones, una composición puede comprender aproximadamente 1 %, aproximadamente 2 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 4 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 6 %, aproximadamente 7 %, aproximadamente 8 %, aproximadamente 9 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 11 %, aproximadamente 12 %, aproximadamente 13 %, aproximadamente 14 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 16 %, aproximadamente 17 %, aproximadamente 18 %, aproximadamente 19 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 21 %, aproximadamente 22 %, aproximadamente 23 %, aproximadamente 24 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 26 %, aproximadamente 27 %, aproximadamente 28 %, aproximadamente 29 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 31 %, aproximadamente 32 %, aproximadamente 33 %, aproximadamente 34 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 36 %, aproximadamente 37 %, aproximadamente 38 %, aproximadamente 39 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 41 %, aproximadamente 42 %, aproximadamente 43 %, aproximadamente 44 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 46 %, aproximadamente 47 %, aproximadamente 48 %, aproximadamente 49 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 51 %, aproximadamente 52 %, aproximadamente 53 %, aproximadamente 54 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 56 %, aproximadamente 57 %, aproximadamente 58 %, aproximadamente 59 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 61 %, aproximadamente 62 %, aproximadamente 63 %, aproximadamente 64 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 66 %, aproximadamente 67 %, aproximadamente 68 %, aproximadamente 69 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 71 %, aproximadamente 72 %, aproximadamente 73 %, aproximadamente 74 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 76 %, aproximadamente 77 %, aproximadamente 78 %, aproximadamente 79 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 81 %, aproximadamente 82 %, aproximadamente 83 %, aproximadamente 84 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 86 %, aproximadamente 87 %, aproximadamente 88 %, aproximadamente 89 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 % o cualquier intervalo entre ellos, de un lípido, tipo de lípido o componente no lipídico particular, tal como un adyuvante, antígeno, péptido, polipéptido, azúcar, ácido nucleico u otro material desvelado en el presente documento o como conocería un experto en la materia. Una composición puede comprender de aproximadamente 10 % a aproximadamente 20 % de lípidos neutros y de aproximadamente 33 % a aproximadamente 34 % de un cerebrósido, y aproximadamente 1 % de colesterol. Un liposoma puede comprender de aproximadamente 4 % a aproximadamente 12 % de terpenos, en donde aproximadamente 1 % de la micela es específicamente licopeno, dejando de aproximadamente 3 % a aproximadamente 11 % del liposoma que comprende otros terpenos; y de aproximadamente 10 % a aproximadamente 35 % de fosfatidilcolina y aproximadamente 1 % de un componente no lipídico. Por tanto, se contempla que las composiciones de la presente invención pueden comprender cualquiera de los lípidos, tipos de lípidos u otros componentes, en cualquier combinación o intervalo de porcentajes.

C. Terapia combinada

Las composiciones de la presente invención, en particular para su uso en la administración de un factor de virulencia secretado o proteína de superficie, incluyendo un dominio 1-2 de coagulasa o una variante del mismo, y/u otros péptidos o proteínas bacterianos para un paciente/sujeto, también se pueden utilizar en combinación con la

administración de terapias tradicionales. Estas incluyen la administración de antibióticos tales como estreptomicina, ciprofloxacina, doxiciclina, gentamicina, cloranfenicol, trimetoprim, sulfametoxazol, ampicilina, tetraciclina o diversas combinaciones de antibióticos.

- 5 En un aspecto, se contempla que una vacuna polipeptídica se use junto con un tratamiento antibacteriano. Como alternativa, la terapia puede preceder o seguir al tratamiento del otro agente en intervalos que varían de minutos a semanas. En realizaciones donde los otros agentes y/o proteínas o polinucleótidos se administran por separado, se garantizaría, en general, que no pasara un periodo de tiempo significativo entre el momento de cada suministro, de manera que el agente y la composición antigénica aún pudieran ejercer un efecto combinado ventajoso en el sujeto.
- 10 En dichos casos, se contempla que se puedan administrar ambas modalidades en un intervalo de aproximadamente 12-24 h entre sí o en un intervalo de aproximadamente 6-12 h entre sí. En algunas situaciones, puede ser conveniente prolongar de manera significativa el periodo de tiempo de la administración, cuando transcurren de varios días (2, 3, 4, 5, 6 o 7) a varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) entre las administraciones respectivas.
- 15 Se pueden emplear diversas combinaciones, por ejemplo, la terapia con antibióticos es "A" y la molécula inmunógena administrada como parte de un régimen de inmunoterapia, tal como un antígeno, es "B":

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

- 20 La administración de las composiciones inmunógenas de la presente invención a un paciente/sujeto, seguirá protocolos generales para la administración de dichos compuestos, teniendo en cuenta la toxicidad, si la hubiera, de la composición de los dominios 1-2 de coagulasa u otras composiciones descritas en el presente documento. Se espera que los ciclos de tratamiento se repitan según sea necesario. También se contempla que diversas terapias convencionales, tales como hidratación, puedan aplicarse en combinación con la terapia descrita.

25 D. Composiciones farmacéuticas generales

- En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se administran a un sujeto. Diferentes aspectos de la presente invención implican administrar una cantidad eficaz de una composición a un sujeto. En algunas realizaciones de la presente invención, antígenos estafilocócicos, miembros de la ruta de Ess, incluyendo polipéptidos o péptidos de la clase Esa o Esx y/o miembros de sustratos de sortasa pueden administrarse al paciente para proteger contra la infección por uno o más patógenos de estafilococos. Como alternativa, un vector de expresión que codifica uno o más de dichos polipéptidos o péptidos puede administrarse a un paciente como tratamiento preventivo. Adicionalmente, dichos compuestos pueden administrarse en combinación con un antibiótico o un antibacteriano. Dichas composiciones se disolverán o dispersarán en general en un vehículo o medio acuoso farmacéuticamente aceptable.

- Además de los compuestos formulados para administración parenteral, tales como los de inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, p. ej., comprimidos u otros sólidos para administración oral; cápsulas de liberación temporalizada; y cualquier otra forma usada en la actualidad, incluyendo cremas, lociones, enjuagues bucales, inhalantes y similares.

- Los compuestos activos pueden formularse para administración parenteral, p. ej., formulados para inyección por las vías intravenosa, intramuscular, subcutáneas o incluso intraperitoneales. Los expertos en la materia conocerán la preparación de una composición acuosa que contiene un compuesto o compuestos que aumentan la expresión de una molécula del MHC de clase I a la luz de la presente divulgación. Normalmente, dichas composiciones pueden prepararse como inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para su uso para preparar soluciones o suspensiones tras la adición de un líquido antes de la inyección; y las preparaciones también pueden emulsionarse.

- 50 Pueden prepararse soluciones de los compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables en agua mezclada adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos, y en aceites. En condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

- 55 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que pueda inyectarse fácilmente. Debería ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

Las composiciones proteicas pueden formularse en forma neutra o salina. Las sales farmacéuticamente aceptables,

incluyen las sales de adición de ácidos (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden obtenerse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio o hidróxidos férricos, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede proporcionarse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. Puede proporcionarse absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Se preparan soluciones inyectables estériles incorporando los compuestos activos en la cantidad necesaria en el disolvente adecuado con otros diversos ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. En general, se preparan dispersiones incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío y liofilización, que producen un polvo del principio activo, más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo.

La administración de las composiciones según la presente invención será normalmente a través de cualquier vía común. Esto incluye la administración oral, nasal o bucal. Como alternativa, la administración puede ser mediante inyección ortotópica, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intranasal o intravenosa. En determinadas realizaciones, se puede inhalar una composición de vacuna (p. ej., patente de los Estados Unidos 6.651.655). Dichas composiciones se administrarían normalmente como composiciones farmacéuticamente aceptables que incluyen vehículos, tampones u otros excipientes fisiológicamente aceptables. Como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a los compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del criterio médico razonable, adecuados para el contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otras complicaciones problemáticas proporcionales a una relación razonable de beneficio/riesgo. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable", significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga líquida o sólida, diluyente, excipiente, disolvente o material de encapsulación, implicado en portar o transportar un agente químico.

Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debería estar adecuadamente tamponada, si es necesario, y el diluyente líquido se vuelve en primer lugar isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los medios acuosos estériles que pueden emplearse serán conocidos por los expertos en la materia a la luz de la presente divulgación. Por ejemplo, una dosificación podría disolverse en solución de NaCl isotónica y añadirse a líquido de hipodermocclisis o inyectarse en el sitio propuesto de infusión, (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 1990). Se producirá necesariamente alguna variación en la dosificación dependiendo de la afección del objeto. La persona responsable de la administración, en cualquier caso, determinará la dosis adecuada para el sujeto individual.

Se determina una cantidad eficaz de composición terapéutica o profiláctica en función del objetivo previsto. La expresión "dosis unitaria" o "dosificación" se refiere a unidades físicamente separadas que son adecuadas para su uso en un sujeto, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de la composición calculada para producir las respuestas deseadas analizadas anteriormente en asociación con su administración, es decir, la vía y el régimen adecuados. La cantidad para administrar, tanto según el número de tratamientos como según la dosis unitaria, depende de la protección deseada.

Las cantidades exactas de la composición también dependen del criterio del facultativo y son peculiares para cada individuo. Los factores que influyen en la dosis incluyen el estado físico y clínico del sujeto, la vía de administración, el objetivo del tratamiento previsto (alivio de los síntomas frente a cura) y la fuerza, estabilidad y toxicidad de la composición en particular.

Tras la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéutica o profilácticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en diversas formas de dosificación, tales como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente.

E. Administración *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*

Como se usa en el presente documento, la expresión administración *in vitro* se refiere a manipulaciones realizadas en células extraídas de un sujeto o fuera de un sujeto, incluyendo células en cultivo. La expresión administración *ex vivo* se refiere a células que se han manipulado *in vitro* y posteriormente se administran a un sujeto. La expresión administración *in vivo* incluye todas las manipulaciones realizadas dentro de un sujeto.

En determinados aspectos de la presente invención, las composiciones pueden administrarse bien *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. En determinadas realizaciones *in vitro*, se incuban líneas celulares de linfocitos B autólogas con un vector de virus durante 24 a 48 horas o con un dominio 1-2 de coagulasa y/o una variante del mismo y/o cualquier otra composición descrita en el presente documento durante dos horas. Las células transducidas se pueden usar después para análisis *in vitro* o, como alternativa para administración *ex vivo*. Las patentes de los Estados Unidos 4.690.915 y 5.199.942 desvelan métodos para manipulación *ex vivo* de células mononucleares de sangre y células de médula ósea para su uso en aplicaciones terapéuticas.

F. Anticuerpos e inmunización pasiva

Se describe un método para preparar una inmunoglobulina para su uso en la prevención o el tratamiento de la infección estafilocócica que comprende las etapas de inmunizar a un receptor o donante con la vacuna de la invención y aislar inmunoglobulina del receptor o donante. Se desvela una inmunoglobulina preparada por este método. Una composición farmacéutica que comprende la inmunoglobulina y un vehículo farmacéuticamente aceptable es un aspecto adicional de la divulgación que podría usarse en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad estafilocócica. Se desvela un método para el tratamiento o la prevención de la infección estafilocócica que comprende una etapa de administrar a un paciente una cantidad eficaz de la preparación farmacéutica.

Se preparan inóculos para la producción de anticuerpos policlonales normalmente dispersando la composición antigénica en un diluyente fisiológicamente tolerable tal como solución salina u otros adyuvantes adecuados para su uso humano para formar una composición acuosa. Se administra una cantidad inmunoestimulante de inóculo a un mamífero y el mamífero inoculado se mantiene durante un tiempo suficiente para que la composición antigénica induzca anticuerpos protectores.

Los anticuerpos pueden aislarse en la medida deseada por técnicas bien conocidas tales como cromatografía de afinidad (Harlow y Lane, 1988). Los anticuerpos pueden incluir preparaciones de antisero de diversos animales utilizados habitualmente, p. ej., cabras, primates, burros, cerdos, caballos, cobayas, ratas o seres humanos.

Una inmunoglobulina producida de acuerdo con la presente divulgación puede incluir anticuerpos completos, fragmentos o subfragmentos de anticuerpos. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas completas de cualquier clase (p. ej., IgG, IgM, IgA, IgD o IgE), anticuerpos quiméricos o anticuerpos híbridos con especificidad doble para dos o más antígenos. También pueden ser fragmentos (p. ej., F(ab')₂, Fab', Fab, Fv y similares) incluyendo fragmentos híbridos. Una inmunoglobulina también incluye proteínas naturales, sintéticas o modificadas por ingeniería genética que actúan como un anticuerpo al unirse a antígenos específicos para formar un complejo.

Se puede administrar una vacuna de la presente invención a un receptor que después actúa como fuente de inmunoglobulina, producida en respuesta a la exposición de la vacuna específica. Un sujeto tratado de este modo donaría plasma a partir del cual se obtendría globulina hiperinmunitaria mediante metodología convencional de fraccionamiento de plasma. La globulina hiperinmunitaria se administraría a otro sujeto para transmitir resistencia contra o tratar la infección estafilocócica. Las globulinas hiperinmunitarias son particularmente útiles para el tratamiento o la prevención de la enfermedad estafilocócica en lactantes, individuos inmunodeprimidos o donde sea necesario tratamiento y no haya tiempo para que el individuo produzca anticuerpos en respuesta a la vacunación.

Se desvela una composición farmacéutica que comprende dos o más anticuerpos monoclonales (o fragmentos de los mismos; preferentemente humanos o humanizados) reactivos contra al menos dos constituyentes de la composición inmunógena de la invención, que podría usarse para tratar o prevenir la infección por bacterias grampositivas, preferentemente estafilococos, más preferentemente *S. aureus* o *S. epidermidis*. Dichas composiciones farmacéuticas comprenden anticuerpos monoclonales que pueden ser inmunoglobulinas completas de cualquier clase, anticuerpos quiméricos o anticuerpos híbridos con especificidad para dos o más antígenos. También pueden ser fragmentos (p. ej., F(ab')₂, Fab', Fab, Fv y similares) incluyendo fragmentos híbridos.

Se conocen bien en la técnica métodos para preparar anticuerpos monoclonales y pueden incluir la fusión de esplénocitos con células de mieloma (Kohler y Milstein, 1975; Harlow y Lane (1988). Como alternativa, se pueden obtener fragmentos monoclonales de Fv explorando una biblioteca de presentación en fagos adecuada (Vaughan *et al.*, 1998). Los anticuerpos monoclonales pueden ser humanizados o parcialmente humanizados por métodos conocidos.

VI. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan con el fin de ilustrar diversas realizaciones de la invención y no se pretende que limiten la presente invención de ninguna manera. Un experto en la materia apreciará fácilmente que la presente invención está bien adaptada para llevar a cabo los objetos y obtener los fines y ventajas mencionados, así como esos objetos, fines y ventajas inherentes en el presente documento. Los presentes ejemplos, junto con los métodos descritos en el presente documento son actualmente representativos de realizaciones preferidas, son ilustrativos y no se pretende que sean limitaciones en el alcance de la invención.

Ejemplo 1

10 COAGULASAS COMO DETERMINANTES DE RESPUESTAS INMUNITARIA PROTECTORAS CONTRA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

A. RESULTADOS

15 Anticuerpos contra dominios de coagulasa Se inmunizaron conejos con Coa marcada con His purificada por afinidad derivada del gen de coagulasa de *S. aureus* Newman (Coa_{NM}). El inmunosuero se examinó mediante ELISA, que reveló respuestas de anticuerpos IgG en suero al antígeno (fig. 1A-1B). Para analizar las respuestas de anticuerpos contra subdominios específicos, se sometieron proteínas recombinantes purificadas por afinidad (D1_{Coa}, D2_{Coa}, D12_{Coa}, L_{Coa} y CT_{Coa}) a ELISA (fig. 1B). El inmunosuero albergaba anticuerpos contra cada uno de los dominios probados (fig. 1B). Cabe observar que los anticuerpos contra L_{Coa} fueron más abundantes que los anticuerpos que reconocieron el dominio de repetición (CT_{Coa}) (L_{Coa} frente a CT_{Coa}, $P < 0,05$). Los anticuerpos contra D12_{Coa} fueron más abundantes que los que reconocieron el dominio de repetición, pero esta diferencia no alcanzó significación estadística (D12_{Coa} frente a CT_{Coa}, $P = 0,066$). Para explorar la función biológica de los anticuerpos en el inmunosuero, los inventores usaron cantidades variables de anticuerpos de Coa_{NM} purificados por afinidad para 25 alterar la asociación de D12_{Coa} con protrombina humana o la asociación de CT_{Coa} con fibrinógeno (fig. 1C). Los inventores calcularon que IgG α -Coa 120 nM bloqueó la unión de D12_{Coa} a la protrombina, mientras que IgG α -Coa 1,7 μ M bloqueó la asociación de CT_{Coa} con fibrinógeno (fig. 1C).

Se sometió inmunosuero de Coa_{NM} de conejo a cromatografía de afinidad usando Coa_{NM} de longitud completa (α -Coa_{NM}), D12_{Coa} (α -D12_{Coa}) o CT_{Coa} (α -CT_{Coa}). Se añadieron cantidades equimolares de IgG purificada por afinidad a muestras de sangre con citrato obtenidas de ratones BALB/c sin exposición previa, que posteriormente se inocularon con *S. aureus* CC8 cepa Newman (Baba 2007). En comparación con las muestras de control sin anticuerpo, IgG tanto α -Coa_{NM} como α -D12_{Coa} provocó un retardo significativo en el tiempo de coagulación, mientras que α -CT_{Coa} no (fig. 1D). Por tanto, los conejos responden a la inmunización con Coa_{NM} generando moléculas de IgG específicas de antígeno que se dirigen predominantemente contra D12_{Coa} y L_{Coa} e interfieren con la actividad de coagulación de Coa secretada. Por el contrario, se generan anticuerpos contra CT_{Coa} en menor abundancia y no interfieren con coagulación *in vitro* de la sangre por *S. aureus* Newman.

Inhibición específica de tipo y de protección cruzada de la coagulación por *S. aureus* Para examinar la capacidad de α -Coa_{NM} para bloquear la coagulación de otras cepas aisladas de infecciones humanas, se añadió IgG específica de antígeno a muestras de sangre con citrato de ratones sin exposición previa que posteriormente se inocularon con *S. aureus* 85/2082 (CC8), MW2 (CC1), MSSA476 (CC1), N315 (CC5), Mu50 (CC5), MRSA252 (CC30), Cowan I (CC30), WIS (CC45) y USA600 (CC45) (tabla 4). IgG específica de Coa_{NM} retardó la coagulación de *S. aureus* Newman (CC8), 85/2082 (CC8) y MW2 (CC1), pero no de MSSA476 (CC1), N315 (CC5), Mu50 (CC1), MRSA252 (CC30), Cowan (CC3), WIS (CC45) y USA600 (CC45) (tabla 4). Estos resultados sugirieron que los anticuerpos contra Coa_{NM} interfieren no solo con la coagulación de cepas de *S. aureus* del mismo tipo de CC (o tipo de Coa), sino que también pueden interferir con la coagulación de cepas de otros tipos (MW2 y MSSA476). El patrón observado de protección cruzada no es universal, ya que cepas del mismo MLST (o tipo de Coa) no se vieron afectadas en la coagulación por anticuerpos contra Coa_{NM}. Para examinar la generalidad de la inhibición específica de tipo y de protección cruzada, se purificaron Coa_{85/2082}, Coa_{MW2}, Coa_{N315}, Coa_{MRSA252} y Coa_{WIS} y se generaron inmunosueros de conejo (tabla 4). IgG específica de Coa_{85/2082} inhibió la coagulación de *S. aureus* Newman (CC8) y 85/2082 (CC8) y, en menor grado, la de N315 (CC5) y Mu50 (CC5). Los anticuerpos dirigidos contra Coa_{N315} inhibieron la coagulación de *S. aureus* N315 (CC5), Mu50 (CC5), Newman (CC8) y 85/2082 (CC8), así como MRSA252 (CC30); sin embargo, estos anticuerpos no afectaron a la coagulación de *S. aureus* Cowan I (el otro aislado de CC30) o de las cepas CC1 y CC45. Los anticuerpos contra Coa_{MRSA252} inhibieron la coagulación de las cepas de *S. aureus* CC1 y CC5 pero no afectaron a la coagulación de los aislados CC30 o CC45. Los anticuerpos contra el aislado CC45 (WIS) inhibieron la coagulación de las cepas de *S. aureus* CC1 pero no afectaron a la coagulación de las cepas CC1, CC5, CC30 o CC45. En resumen, la coagulación de sangre de ratón por cepas de *S. aureus* fue inhibida invariablemente por anticuerpos inducidos contra la Coa correspondiente (aislados CC8, CC5, CC1 y CC30). Se observa neutralización cruzada de la coagulación para los anticuerpos dirigidos contra las dos coagulasas de las cepas CC8 y para cada una de las coagulasas de las cepas CC1 y CC5. Finalmente, los anticuerpos dirigidos contra Coa de las cepas CC1, CC5, CC8, CC30 y CC45 no neutralizaron la coagulación de las cepas de *S. aureus* CC45 o de Cowan I (CC30). Se supone que la coagulación de la sangre en estos aislados puede depender de otro factor, por ejemplo, vWbp (véase posteriormente).

Tabla 4. Inhibición específica de tipo o de protección cruzada de la coagulación estafilocócica por anticuerpos de Coa

Anticuerpos específicos de Coa inducidos contra coagulinas de diferentes cepas de <i>S. aureus</i>							
<i>S. aureus</i>	Tipo de CC	α -Coa _{Newman}	α -Coa _{86/2082}	α -Coa _{MW2}	α -Coa _{N315}	α -Coa _{MRSA252}	α -Coa _{WIS}
Newman	8	1,7	1,5	1,7	1,9	1,7	1,7
85/2082	8	1,5	1,8	1,3	1,5	1,6	1,4
MW2	1	1,2	1,1	1,1	0,8	1,1	1,0
MSSA476	1	1,0	1,1	1,2	0,9	1,4	1,2
N315	5	1,1	1,2	1,3	1,2	1,3	1,2
Mu50	5	1,0	1,2	1,2	1,2	1,1	0,9
MRSA252	30	0,9	1,2	1,2	1,3	1,0	0,9
Cowan I	30	0,9	1,0	1,0	0,9	1,0	0,8
WIS	45	1,1	1,2	1,2	0,8	1,2	0,9
USA600	45	0,8	1,0	1,2	1,2	0,8	0,8

Anticuerpos de coagulasa y su efecto protector sobre la enfermedad estafilocócica Se emulsionaron Coa_{NM}, D12_{Coa} o CT_{Coa} purificados y se inyectaron como un régimen de sensibilización-refuerzo en ratones BALB/c (n = 10). Se examinaron sueros de animales inmunizados de manera simulada (PBS) o con Coa_{NM}, D12_{Coa} y CT_{Coa} mediante ELISA con respecto a las respuestas de IgG al antígeno, lo que reveló respuestas inmunitarias específicas en animales vacunados pero no en ratones de control (fig. 2A-2B). Cabe observar que la inmunización de ratones con Coa_{NM} indujo predominantemente anticuerpos contra D12_{Coa} y, en menor grado, anticuerpos que se dirigían contra CT_{Coa} (fig. 2A). La inmunización con D12_{Coa} aumentó los anticuerpos de alto título que reaccionaron con Coa_{NM} de longitud completa (fig. 26A). Por el contrario, La inmunización con CT_{Coa} generó respuestas de anticuerpos débiles (fig. 2A). Los ratones se expusieron mediante inyección intravenosa a *S. aureus* Newman y se usó un periodo de observación de 10 días para evaluar la protección contra septicemia letal (fig. 2B). En comparación con los animales inmunizados de manera simulada, la vacunación con Coa_{NM}, D12_{Coa} o CT_{Coa} dio lugar a mayor tiempo transcurrido hasta la muerte (Coa_{NM} frente a PBS, P < 0,001; D12_{Coa} frente a PBS, P < 0,01; CT_{Coa} frente a PBS, P < 0,05). Las respuestas inmunitarias contra Coa_{NM} no superaron significativamente la vacunación con D12_{Coa} o CT_{Coa} en la generación de protección contra exposición a *S. aureus* letal (Coa_{NM} frente a CT_{Coa}, P > 0,05; D12_{Coa} frente a CT_{Coa}, P > 0,05).

Se probó si los anticuerpos dirigidos contra D12_{Coa} o CT_{Coa} proporcionan protección contra exposición letal a *S. aureus*. Se inyectó IgG de conejo purificada por afinidad en la cavidad peritoneal de ratones BALB/c sin exposición previa a una concentración de 5 mg/kg de peso corporal (fig. 2C). Veinticuatro horas después, los animales se expusieron mediante inyección intravenosa de *S. aureus* Newman (fig. 2C). En comparación con los anticuerpos de control [IgG (α -V10) específicos para el antígeno protector de la peste V10 (DeBord 2006)], IgG dirigidas contra Coa_{NM}, D12_{Coa} o CT_{Coa} provocaron cada una un retardo en el tiempo transcurrido hasta la muerte para la cohorte correspondiente de animales expuestos (todas las vacunas frente a PBS, P < 0,05) (fig. 2C). No se detectaron diferencias significativas en la protección contra la enfermedad entre los anticuerpos dirigidos contra D12_{Coa}, CT_{Coa} o Coa_{NM} de longitud completa (fig. 2C). Por tanto, en comparación con D12_{Coa} y L_{Coa}, la inmunización con el dominio de TC_{Coa} induce bajas respuestas de anticuerpos, sin embargo, la transferencia pasiva de anticuerpos contra D12_{Coa} y CT_{Coa} proporciona niveles similares de protección contra exposición letal a *S. aureus*. Estos datos sugieren que la neutralización mediada por anticuerpos de la actividad coagulasa de *S. aureus* Newman no es un requisito para la protección contra la enfermedad. Después de la exposición a Coa_{NM} de longitud completa, los ratones BALB/c montan respuestas inmunitarias robustas contra D12_{Coa} y L_{Coa}, pero generan pocos anticuerpos contra CT_{Coa}.

Anticuerpos contra dominios de proteína de unión al factor de von Willebrand Se inmunizaron conejos con vWbp marcado con His purificado por afinidad derivado del gen *vwb* de *S. aureus* Newman (vWbp_{NM}). El inmunosuero se examinó mediante ELISA, que reveló respuestas de anticuerpos IgG en suero al antígeno (fig. 3A-3B). Para analizar las respuestas de anticuerpos contra subdominios específicos, se sometieron D1_{vWbp}, D2_{vWbp}, D12_{vWbp}, L_{vWbp} y CT_{vWbp} purificados por afinidad a ELISA (fig. 3B). El inmunosuero albergaba anticuerpos contra cada uno de los subdominios probados (fig. 3B). Cabe observar que los anticuerpos contra los D1_{vWbp} y D2_{vWbp} eran menos abundantes que los anticuerpos que reconocían estos dos dominios juntos (D12_{vWbp}). En comparación con las respuestas inmunitarias contra D12_{vWbp}, los anticuerpos dirigidos contra el CT_{vWbp} fueron 30 % menos abundantes (D12_{vWbp} frente a CT_{vWbp}, P > 0,05). Para explorar la función biológica de los anticuerpos en el inmunosuero, los inventores usaron cantidades variables de IgG específica de vWbp_{NM} para alterar la asociación de D12_{vWbp} con protrombina humana y la asociación de CT_{vWbp} con fibrinógeno (fig. 3C-3D). Los inventores calcularon que IgG α -vWbp 1,3 μ M bloqueó la unión de D12_{vWbp} a la protrombina, mientras que IgG α -vWbp 1,3 μ M bloqueó la asociación de CT_{vWbp} con fibrinógeno (fig. 3D).

Se añadieron cantidades equimolares de IgG purificada por afinidad a muestras de sangre con citrato obtenidas de ratones BALB/c sin exposición previa, que posteriormente se inocularon con una *coa* mutante procedente de *S.*

aureus Newman (Cheng 2010). En comparación con las muestras de control sin anticuerpo, tanto α -vWbp como α -D12_{vWbp} provocaron pequeños retardos en el tiempo de coagulación, mientras que α -CT_{vWbp} no retardó el tiempo de coagulación (fig. 3D). Por tanto, los conejos responden a la inmunización con vWbp_{NM} mediante la generación de moléculas de IgG específicas de antígeno que se dirigen contra D12_{vWbp}, L_{vWbp} y CT_{vWbp}. Los anticuerpos contra D12_{vWbp} interfieren con la coagulación mediada por vWbp de sangre de ratón *in vitro*.

Anticuerpos contra vWbp y su efecto protector sobre la enfermedad estafilocócica Se emulsionaron vWbp_{NM}, D12_{vWbp} o CT_{vWbp} purificados y se inyectaron como un régimen de sensibilización-refuerzo en ratones BALB/c (n = 10). Se examinaron sueros de animales inmunizados de manera simulada (PBS) o con vWbp_{NM}, D12_{vWbp} y CT_{vWbp} mediante ELISA con respecto a las respuestas de IgG al antígeno, lo que reveló respuestas inmunitarias específicas en animales vacunados pero no en ratones de control (fig. 4A-4B). Cabe observar que la inmunización de ratones con vWbp_{NM} indujo predominantemente anticuerpos contra D12_{Coa} y, en menor grado, anticuerpos que se dirigían contra CT_{vWbp} (fig. 4A). La inmunización con D12_{vWbp} aumentó los anticuerpos de alto título que reaccionaron con vWbp_{NM} de longitud completa (fig. 4A). Por el contrario, la inmunización con CT_{vWbp} generó respuestas de anticuerpos débiles (fig. 28A). Los ratones se expusieron mediante inyección intravenosa a *S. aureus* Newman y se usó un periodo de observación de 10 días para evaluar la protección contra septicemia letal (fig. 4B). En comparación con los animales inmunizados de manera simulada, la vacunación con vWbp_{NM}, D12_{vWbp} o CT_{vWbp} dio lugar a mayor tiempo transcurrido hasta la muerte (vWbp_{NM} frente a PBS, P < 0,01; D12_{vWbp} frente a PBS, P < 0,05; CT_{vWbp} frente a PBS, P < 0,05). Las respuestas inmunitarias contra vWbp_{NM} superaron la vacunación con D12_{vWbp} pero no CT_{vWbp} en la generación de protección contra exposición a *S. aureus* letal (vWbp_{NM} frente a D12_{vWbp}, P < 0,05; vWbp_{NM} frente a CT_{vWbp}, P > 0,05) (fig. 4B).

Se examinó si los anticuerpos dirigidos contra D12_{vWbp} o CT_{vWbp} proporcionan protección contra exposición letal a *S. aureus*. Se inyectó IgG de conejo purificada por afinidad en la cavidad peritoneal de ratones BALB/c sin exposición previa a una concentración de 5 mg/kg de peso corporal (fig. 4C). Veinticuatro horas después, los animales se expusieron mediante inyección intravenosa de *S. aureus* Newman (fig. 4C). En comparación con los anticuerpos de control (α -V10), IgG dirigidas contra vWbp_{NM}, D12_{vWbp} o CT_{vWbp} provocaron cada una un retardo en el tiempo transcurrido hasta la muerte para la cohorte correspondiente de animales expuestos (todas las vacunas frente a PBS, P < 0,05) (fig. 4C). No se detectaron diferencias significativas en la protección contra la enfermedad entre los anticuerpos dirigidos contra D12_{vWbp}, CT_{vWbp} o vWbp_{NM} de longitud completa (fig. 4C). Por tanto, en contraste con D12_{vWbp}, la inmunización con el dominio de CT_{vWbp} induce bajas respuestas de anticuerpos. La transferencia pasiva de anticuerpos contra D12_{vWbp} y CT_{vWbp} proporciona niveles similares de protección contra exposición letal a *S. aureus* Newman. Estos datos sugieren que la neutralización mediada por anticuerpos de vWbp de *S. aureus* Newman, que puede producirse por anticuerpos dirigidos contra D12_{vWbp} o CT_{vWbp}, se correlaciona con la protección contra la enfermedad. Después de la exposición a vWbp_{NM} de longitud completa, los ratones BALB/c montan respuestas inmunitarias robustas contra D12_{vWbp} y L_{vWbp}, pero generan pocos anticuerpos contra CT_{vWbp}.

Atributos de protección cruzada de la vacuna de Coa_{NM}/vWbp_{NM} Coa_{NM} y vWbp_{NM} recombinantes purificadas se emulsionaron y se inyectaron en ratones BALB/c (n = 10) como un régimen de inmunización de sensibilización-refuerzo. Se examinaron sueros de animales inmunizados de manera simulada (PBS) y con Coa_{NM}/vWbp_{NM} mediante ELISA con respecto a respuestas de IgG a Coa_{NM} así como vWbp_{NM}, lo que reveló respuestas inmunitarias específicas de antígeno en ratones vacunados pero no en ratones de control (fig. 5A). Se usaron inyección intravenosa de ratones con *S. aureus* y un periodo de observación de 10 días para evaluar la protección de la vacuna contra la exposición letal con diversas cepas (fig. 5). Como control, la inmunización con Coa_{NM}/vWbp_{NM} aumentó la protección contra *S. aureus* Newman (CC8) (Cheng 2010) (datos no mostrados) y USA300 (CC8), pero no contra MW2 (CC1) o N315 (CC5) (fig. 5B-5D). No obstante, la inmunización con Coa_{NM}/vWbp_{NM} generó protección contra la exposición con *S. aureus* Cowan I (CC30) y WIS (CC45). En conjunto, estos datos indican que la vacuna de Coa_{NM}/vWbp_{NM} proporcionó inmunidad específica de tipo, así como protección cruzada contra algunas de, pero no todas, las cepas de tipo coagulasa (fig. 5E-5F).

Respuestas inmunitarias inducidas por la vacuna Coa₄/vWbp₂ El polipéptido modificado por ingeniería genética Coa₄ alberga los dominios D12 de Coa_{MRSA252}, Coa_{MW2}, Coa_{N315} y Coa_{USA300} de longitud completa además de marcadores His₆ N-terminal y STREP C-terminal (fig. 6A). Coa₄ se purificó mediante cromatografía de afinidad en StrepTactin-sepharose (fig. 6B). Cuando se analizó mediante SDS-PAGE teñida con Coomassie, la Coa purificada por afinidad se reveló como un polipéptido de 190 kDa (fig. 30B). Coa₄ abarca los dominios D12 de los aislados de *S. aureus* de tipo coagulasa más frecuentes de pacientes norteamericanos (CC1, CC5, CC8, CC30, CC45) (DeLeo 2010). El polipéptido vWbp₂ abarca el dominio D12 de vWbp_{N315} y vWbp_{USA300} de longitud completa además de marcadores His₆ N-terminal y STREP C-terminal (fig. 6A). vWbp₂ se purificó mediante cromatografía de afinidad, lo que produjo un polipéptido que migraba con la masa esperada de 85 kDa en SDS-PAGE teñida con Coomassie (fig. 6B). Se inmunizaron ratones (n = 5) con un régimen de sensibilización-refuerzo de Coa_{NM}/vWbp_{NM} o Coa₄/vWbp₂ y se examinaron las respuestas inmunitarias a diversos tipos de proteínas de unión al factor de von-Willebrand y coagulasa mediante ELISA (fig. 6C-6D). La vacuna Coa_{NM}/vWbp_{NM} indujo anticuerpos en ratones que se unieron a las coagulasas de las cepas CC8 pero presentaron poca reactividad cruzada hacia Coa_{N315}, Coa_{MRSA252}, Coa_{MW2} o Coa_{WIS}. En comparación, la inmunización con Coa₄ indujo anticuerpos de título mayor no solo contra coagulasas de tipo CC8, sino también contra las coagulasas de las cepas CC1, CC5, CC30 y CC45. En comparación con vWbp_{NM}, vWbp₂ indujo anticuerpos de título alto contra vWbp de las cepas CC5 y CC8 (fig. 6D).

Atributos de protección cruzada de la vacuna de Coa₄/vWbp₂. Se emulsionó Coa₄/vWbp₂ recombinante purificada y se inyectó en ratones BALB/c (n = 10) como un régimen de inmunización de sensibilización-refuerzo. Se examinaron sueros de animales inmunizados de manera simulada (PBS) y con Coa₄/vWbp₂ mediante ELISA con respecto a respuestas de IgG a Coa₄ así como vWbp₂, lo que reveló respuestas inmunitarias específicas de antígeno en ratones vacunados pero no en ratones de control (fig. 7A). Se usaron inyección intravenosa de ratones con *S. aureus* y un periodo de observación de 10 días para evaluar la protección de la vacuna contra la exposición letal con diversas cepas (fig. 7). Como cabía esperar, la inmunización con Coa₄/vWbp₂ indujo protección contra la cepa de *S. aureus* CC8 USA300 (Cheng 2010). De manera similar a la inmunización con Coa_{NM}/vWbp_{NM}, la vacuna de Coa₄/vWbp₂ indujo protección contra exposición a *S. aureus* Cowan I (CC30) y WIS (CC45). A diferencia de Coa_{NM}/vWbp_{NM}, Coa₄/vWbp₂ protegió a los ratones contra la exposición letal con *S. aureus* N315 (CC5) o MW2 (CC1) (figs. 7B-7D). En conjunto, estos datos indican que la vacuna de Coa_{NM}/vWbp_{NM} proporcionó inmunidad específica de tipo, así como protección cruzada contra algunas de, pero no todas, las cepas de tipo coagulasa (fig. 7E-7F). Además, la vacuna de Coa₄/vWbp₂ protegió a los animales contra una exposición con los tipos de CC de *S. aureus* relevantes aislados de pacientes norteamericanos con enfermedad estafilocócica.

Los inventores también examinaron si la inmunización con Coa₄/vWbp₂ puede proteger a los ratones contra la formación de abscesos estafilocócicos. Los ratones BALB/c se inmunizaron con un régimen de sensibilización-refuerzo de Coa₄/vWbp₂ o control simulado y se expusieron mediante inoculación intravenosa de una dosis subletal de las cepas de *S. aureus* USA300, N315, MW2 o Cowan I. Cinco días después de la exposición, se sacrificaron los animales, se les realizó una necropsia y se extrajeron sus riñones. Se fijaron los tejidos para uno de los dos riñones de cada ratón, se cortaron en secciones delgadas y se tiñeron con hematoxilina/eosina para su posterior análisis histopatológico (tabla 5). Los tejidos de los otros riñones se homogeneizaron y se extendieron sobre placas de agar para enumerar la carga estafilocócica como unidades formadoras de colonias (tabla 5). La inmunización con Coa₄/vWbp₂ afectó a la carga bacteriana en tejidos renales de ratones infectados con diversas cepas de *S. aureus*, lo que condujo a una reducción significativa para *S. aureus* MW2 y Cowan I, pero no para USA300 y N315. Este es un resultado esperado, ya que los anticuerpos específicos de Coa o vWbp no promueven la destrucción opsonofagocítica de bacterias, sino que interfieren con la formación de abscesos estafilocócicos, reduciendo de este modo la capacidad de los estafilococos para replicarse dentro del entorno protector de estas lesiones (Cheng 2010). En comparación con los animales inmunizados de manera simulada, la inmunización con Coa₄/vWbp₂ redujo la formación de abscesos estafilocócicos en los tejidos renales cinco días después de la exposición con las cepas de *S. aureus* USA300, Cowan I, MW2 o N315 (tabla 5).

Tabla 5. Inmunización activa de ratones con Coa₄/vWbp₂ y protección contra la exposición con las cepas de *S. aureus* USA300, N315, MW2 o Cowan I

Vacuna	Carga estafilocócica en tejido renal			Formación de abscesos	
	^a log ₁₀ UFC·g ⁻¹ (ETM)	^b Significación (valor de P)	^c Reducción (log ₁₀ UFC·g ⁻¹)	^a Número de lesiones	^e Significación (valor de P)
<i>S. aureus</i> USA300					
Simulado	7,31 (0,37)	-	-	8,8 (1,72)	-
Coa ₄ /vWbp ₂	6,48 (0,41)	0,150	0,835	4,3 (1,11)	0,0434
<i>S. aureus</i> N315					
Simulado	7,25 (0,13)	-	-	16,6 (1,49)	-
Coa ₄ /vWbp ₂	7,10 (0,24)	0,805	0,151	11,3 (0,84)	0,0205
<i>S. aureus</i> MW2					
Simulado	8,04 (0,25)	-	-	66,5 (8,41)	-
Coa ₄ /vWbp ₂	7,25 (0,20)	0,029	0,789	27,5 (4,39)	0,0011
<i>S. aureus</i> Cowan I					
Simulado	6,94 (0,16)	-	-	7,9 (1,27)	-
Coa ₄ /vWbp ₂	5,59 (0,51)	0,028	1,35	4,6 (0,73)	0,0279

Los primeros trabajos sobre la coagulasa demostraron que, después de la infección por *S. aureus*, los seres humanos así como los animales generan anticuerpos específicos de Coa (Tager 1948; Lominski, 1946). Cuando se transfieren a conejos sin exposición previa, estos anticuerpos pueden neutralizar la coagulación por *S. aureus* y, al menos en algunos casos, puede conferir inmunidad a la exposición con *S. aureus* (Lominski, 1949; Lominski, 1962). La inmunización activa de conejos con preparaciones que contienen coagulasa podría prolongar la vida de los conejos que se habían expuesto mediante inoculación intravenosa con dosis letales de *S. aureus* (Boake, 1956). La comparación de diferentes aislados de *S. aureus* (de tipo fago) para la inhibición de la coagulación del plasma por el antisero de coagulasa reveló neutralización tanto específica como inespecífica del tipo de fago (Lominski 1946; Lominski 1962; Rammelkamp 1950; Duthie 1952; Harrison 1964). Estos datos apoyaron un concepto general para la existencia de tipos serológicos de Coa, que no están estrictamente vinculados a tipos de fago de *S. aureus*.

(Rammelkamp 1956).

Toxoide de coagulasa purificado, que abarca Coa purificada de las cepas de *S. aureus* M1 y Newman adsorbidas en fosfato de aluminio, se examinó para determinar la inmunización terapéutica de 71 pacientes con furunculosis crónica (Harrison 1963). En comparación con el placebo, la inmunización contra la coagulasa generó un aumento en los títulos de anticuerpos específicos de coagulasa, pero no logró mejorar el resultado clínico de la furunculosis crónica (Harrison 1963). Cabe observar que no se examinó el desarrollo de anticuerpos neutralizantes o la posibilidad de inmunidad específica de tipo (Harrison 1963). Por tanto, aunque los primeros trabajos revelaron la eficacia preclínica de las vacunas de subunidades de coagulasa, los estudios clínicos no consiguieron demostrar la eficacia en un ensayo en seres humanos. Ya que la mayoría de estos estudios se realizaron entre 1945 y 1965, se deben considerar las herramientas limitadas para el aislamiento de coagulasas muy purificadas, así como la incapacidad para tipificar cepas de *S. aureus* o preparaciones de vacunas de coagulasa en función de su secuencia de nucleótidos. Además, se han realizado estudios anteriores sin conocimiento de vWbp o de los mecanismos moleculares de la activación de protrombina mediada por Coa y vWbp y la escisión de fibrinógeno (Friedrich 2003; Kroh 2009). Los inventores han observado recientemente que tanto, aunque las coagulasas secretadas por *S. aureus* Newman, Coa_{NM} y vWbp_{NM}, son suficientes para que la capacidad de esta cepa provoque formación de abscesos y bacteriemia letal rápida en ratones (Cheng 2010). En experimentos de inmunización activa y pasiva, fueron necesarios anticuerpos tanto contra Coa_{NM} como contra vWbp_{NM} para conferir protección contra la formación de abscesos o bacteriemia letal (Cheng 2010). En función de estas observaciones, los inventores plantean la hipótesis de que las coagulasas pueden actuar como antígenos protectores que inducen respuestas de anticuerpos contra Coa y vWbp, que protegen a los animales y a los seres humanos contra enfermedad por *S. aureus* (Cheng 2010). De acuerdo con este modelo, la expresión de *coa* y *vwb* es un rasgo universal de cepas de *S. aureus* (Cheng 2011). Cabe observar que el gen *coa* de aislados de *S. aureus* es variable (McCarthy 2010), con mayor variación en la secuencia de aminoácidos incluso que las repeticiones en tándem del gen de la proteína A (*spa*); la variación en *spa* se utiliza para experimentos de tipificación epidemiológica (Watanabe 2009; Koreen 2004). Aún no se han aislado mutantes de *S. aureus* que no pueden expresar *coa* de seres humanos con enfermedad estafilocócica manifiesta. El gen *vwb* es menos variable (McCarthy 2010). Analizando secuencias del genoma de *S. aureus* disponibles en la actualidad para determinar la homología de *vwb*, se identificaron tres alelos. Dos de los alelos de *vwb* variaron en su secuencia codificante para el dominio D12 (*S. aureus* N315 y USA300 son representativos de estos alelos), mientras que el tercer alelo albergaba una supresión de nucleótido en el codón 102, que crea un desplazamiento de marco que da lugar a una mutación sin sentido en el codón 107 (*S. aureus* MRSA252).

Gracias a estas observaciones, se informa aquí de que la inmunización con Coa y vWbp de conejos o ratones generó predominantemente anticuerpos contra el dominio D12 de Coa_{NM} o vWbp_{NM}. Los anticuerpos específicos de D12 neutralizaron las actividades coagulasa de *S. aureus* Newman y, cuando se transfirieron a animales sin exposición previa, confirieron protección contra bacteriemia letal. Se produjo neutralización y protección contra enfermedades de anticuerpos específicos de Coa_{NM} y vWbp_{NM} de una manera específica de tipo, de manera similar a la inmunidad específica de tipo indicada para proteínas M de *Streptococcus pyogenes* (Lancefield 1928; Lancefield 1962) o los antígenos de pilus (T) de *S. pyogenes* y *Streptococcus agalactiae* (Mora 2005; Nuccitelli 2011). A la luz del enfoque de vacunación estructural para antígenos de pilus (Nuccitelli 2011; Schneewind 2011), los inventores diseñaron dos polipéptidos que abarcan los dominios D12 de los principales tipos de Coa y vWbp de los aislados de *S. aureus* norteamericanos: cepas CC1, CC5, CC8, CC30 y CC45 (Tenover 2012). Los productos purificados, Coa₄ y vWbp₂, se usaron como antígenos e indujeron respuestas de anticuerpos contra los dominios D12 de cada tipo de Coa y vWbp examinado. La inmunización de ratones con Coa₄/vWbp₂ proporcionó protección contra la exposición de bacteriemia letal con cepas de *S. aureus* CC1, CC5, CC8, CC30 y CC45 representativas. Por tanto, los criterios de diseño de la vacuna de Coa₄/vWbp₂, para generar respuestas inmunitarias universales contra Coa y vWbp contra *S. aureus* clínicamente relevante, se han cumplido.

Además de la neutralización específica de tipo de Coa y vWbp a través de anticuerpos dirigidos contra el dominio D12, los anticuerpos contra los dominios R (Coa) y CT (vWbp) también proporcionaron protección contra enfermedad por *S. aureus*. Ya que los anticuerpos contra los dominios R y CT no afectan a la coagulación de la fibrina a través de los complejos de protrombina Coa y protrombina vWbp secretados, se supone que estos mecanismos inmunitarios adaptativos se dirigen a coagulasas a través de otro mecanismo. En la actualidad no se aprecia cómo los anticuerpos contra el dominio R de Coa o el dominio CT de vWbp proporcionan protección. Parece plausible que estos anticuerpos puedan mediar en la eliminación de Coa y vWbp de la circulación mediante la unión de complejos inmunitarios a receptores de Fc en macrófagos. Hasta que se revele el mecanismo molecular de protección, no se puede apreciar el valor general de una estrategia de vacuna que se dirige a los dominios R y CT de Coa y vWbp.

B. MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y crecimiento de cultivos Se cultivaron cepas de *S. aureus* en agar o caldo de soja trípico a 37 °C. Se cultivaron cepas de *E. coli* DH5α y BL21 (DE3) en agar o caldo Luria Bertani a 37 °C. Se usó ampicilina (100 µg/ml) para la selección de pET15b y pGEX2tk. Los cebadores utilizados para la amplificación del ADN estafilocócico se encuentran en la tabla 6.

Tabla 6. Cebadores utilizados	
Nombre del cebador	Secuencia
F-N315coa	CGCGGATCCATAGTAACAAAGGATTATAGTAAAGAAATCAAG (SEQ ID NO: 1)
R-N315coa	TCCCCCGGGTATTTTGTACTCTAGGCCCAT (SEQ ID NO: 2)
R-Tabla 6.	CGCGGATCCATAGTAACAAAGGATTATAGTGGGAAA (SEQ ID NO: 3)
R-MW2coa	TCCCCCGGGTATTTTGTACTCTAGGCCCAT (SEQ ID NO: 4)
F-M252coa	CGCGGATCCATAGTAACAAAGGATTATAGTAAAGAAATCAAGAG (SEQ ID NO: 5)
R-M252coa	TCCCCCGGGT A TTTTGT ACT CT AGGACCA T ATGTC (SEQ ID NO: 6)
F-U300coa	CGCGGATCCATAGTAACAAAGGATTATAGTGGGAAAT (SEQ ID NO: 7)
R-U300coa	TCCCCCGGGTATTTTGTACTCTAGGCCCAT (SEQ ID NO: 8)
F-WIScoa	CGCGGATCCATAGTAACAAAGGATTATAGTGGGAAAT (SEQ ID NO: 9)
R-WIScoa	TCCCCCGGGTATTTTGTACTCTAGGACCATATGTC (SEQ ID NO: 10)
F-85coa	CGCGGATCCATAGTAACAAAGGATTATAGTAAAGAAATCAAGAG (SEQ ID NO: 11)
R-85coa	TCCCCCGGGTATTTTGTACTCTAGGACCATATGTC (SEQ ID NO: 12)
F-VUSA300FL-XhoI	CCGCTCGAGGTGTTTCTGGGGAGAAG (SEQ ID NO: 13)
R-VUSA300FL-BamHI	CGGGATCCTTATTTGCCATTATATACATTATTGATTT (SEQ ID NO: 14)
F-VN315FL-XhoI	CCGCTCGAGGTGTTTCTGGGGAGAAG (SEQ ID NO: 15)
R-VN315FL-BamHI	CGGGATCCTTATTTGCCATTGTATACCTTTATTG (SEQ ID NO: 16)
F-CUSA300-NcoI	CATGCCATGGCCTAGGATAGTAACAAAGGATTATAGTGGGAAA T (SEQ ID NO: 17)
R-CUSA300-BamHI	CGGGATCCTTATTTTGTACTCTAGGCCCAT (SEQ ID NO: 18)
F-CN315-NcoI	CATGCCATGGCTCGAGATAGTAACAAAGGATTATAGTAAAGAA TC (SEQ ID NO: 19)
R-CN315-AvrII	CCTAGGGCGGACCATATTGAGAAGC (SEQ ID NO: 20)
F-CMW2-NcoI	CATGCCATGGCCGGGATAGTAACAAAGGATTATAGTGGGAAA (SEQ ID NO: 21)

Tabla 6. Cebadores utilizados (continuación)	
Nombre del cebador	Secuencia
R-CMW2-XhoI	GGCTCGAGTTTTTGACAGTTTTATTTTCCA (SEQ ID NO: 22)
F-CMRSA-NcoI	CATGCCATGGCCCCGGGATAGTAAGTAAAGATTATAGTAAAGAA TCAAGAG (SEQ ID NO: 23) TCCCCGCGGATTTTGACGGTCTTGTTTTCCAAGATT (SEQ ID NO: 24) CATGCCATGGCCTAGGGTGGTTCTGGGAGAAG (SEQ ID NO: 25) CGGGATCCTTATTGGCCATTATATACTTTATTGATTT (SEQ ID NO: 26) CATGCCATGGCTCGAGGTGGTTCTGGGAGAAG (SEQ ID NO: 27) CCTAGGTGATTGTTAAAGTCCTTAAATCAC (SEQ ID NO: 28) CATGCCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCA TAGTAACTAAAGATTATAGTAAAGAAATCAAGAG (SEQ ID NO: 29) CATGCCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCG TGGTTTCTGGGAGAAG (SEQ ID NO: 30) CGGGATCCTTACTTCTCAAATTGAGGATGAGACCATTTTGTAC TCTAGGCCCCATA (SEQ ID NO: 31) CGGGATCCTTACTTCTCAAATTGAGGATGAGACCATTTGCCATT ATATACTTTATTGATTT (SEQ ID NO: 32)
R-CMRSA-SacII	
F-VUSA300-NcoI	
R-VUSA300-BamHI	
F-VN315-NcoI	
R-VN315-AvrII	
F-His-CMRSA	
F-His-VN315	
R-USA300CoaStrep	
R-USA300vwbStrep	

Coa4 y vWbp2 Para generar las proteínas híbridas, se amplificaron por PCR *coa* y *vwb* de la cepa USA300. El cebador 5' incluía el sitio de restricción (NcoI) para insertar en el vector (pET15b), así como una enzima de restricción adicional (AvrII) para uso futuro. El cebador 3' incluía el sitio de restricción (BamHI) para inserción del vector. Los insertos se clonaron en la cepa de *E. coli* DH5 α . En cada ciclo de clonación posterior, el D12 del siguiente alelo se añadió al vector 5' en el inserto anterior. En cada caso, el cebador 5' incluía el sitio del vector (NcoI) y un sitio de enzima de restricción adicional para uso futuro. El cebador 3' para cada inserto secuencial contenía el sitio de restricción (AvrII para N315) incluido en el cebador 5' para el inserto anterior. La región promotora y el promotor de His se restauraron en un ciclo posterior de clonación y se añadió un marcador STREP C-terminal en otro ciclo de clonación. Se secuenció el vector completo para verificar la calidad de la secuencia de ADN. Finalmente, cada vector se transformó en la cepa de *E. coli* BL21 para la expresión y purificación de proteínas.

Purificación de proteínas Se cultivaron *E. coli* BL21 (DE3) que albergaban vectores de expresión que contenían *coa* de *S. aureus* Newman; *vwb* de las cepas de *S. aureus* Newman, USA3000 y N315; o los subdominios de *coa* y *vwb*; y vectores de expresión que contienen la secuencia genética para las proteínas híbridas Coa4 y vWbp2, a 37 °C y se indujeron con IPTG 100 mM durante una noche a temperatura ambiente. Debido a la degradación durante la purificación de Coa, se utilizaron vectores de expresión pGEX2tk en *E. coli* Dh5 α para expresar *coa* de USA300, N315, MW2, MRSA252, 85/2082 y WIS como construcciones marcadas con GST. Tres horas después de la inducción, las células se centrifugaron a 7.000 x g, se suspendieron en tampón de columna 1x (Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, NaCl 0,5 M) y se lisaron en una prensa de French a 985,18 kg/cm² (14.000 lb/in²). Los lisados se sometieron a ultracentrifugación a 40.000 x g durante 30 min. El sobrenadante de las construcciones pET15b se sometió a cromatografía Ni-NTA, se lavó con tampón de columna e imidazol 10 mM y se eluyó con imidazol 500 mM. Para proteínas marcadas con strep, los sobrenadantes de lisado se sometieron a cromatografía sobre StrepTactin Sepharose (GE Healthcare), se lavaron en tampón de lavado strep 1x (Tris-HCl 0,1 M, pH 8, NaCl 0,150 M, EDTA 0,1 M) y se eluyeron en tampón de lavado strep 1x que contenía destiobiotina 2,5 mM. Para proteínas marcadas con GST, el sobrenadante de lisados clarificados se sometió a cromatografía de glutatión-sepharose. Para eliminar el marcador de GST, después del lavado con tampón de columna, el tampón de columna se cambió a tampón de escisión de proteasa PreScission que contenía DTT 10 mM y la columna se incubó con proteasa PreScission (GE Healthcare) durante una noche en la definición de unidad proporcionada por GE. Se recogió después proteína liberada que carecía del marcador de GST con tampón de escisión de proteasa adicional. Los eluidos se dializaron frente a PBS. Para eliminar la endotoxina, se añadió Triton-X114 1:100 y la solución se enfrió durante 10 minutos, se incubó a 37 °C durante 10 min y se centrifugó a 13.000 x g. Esto se repitió dos veces. El sobrenadante se cargó en una columna de desalación HiTrap para eliminar los restos de Triton-XI 14.

Anticuerpos de conejo La concentración de proteína se determinó usando un equipo BCA (Pierce). La pureza se verificó mediante análisis de SDS-PAGE y tinción con azul brillante de Coomassie. Para la inmunización inicial, hembras de conejos blancos de Nueva Zelanda de seis meses de vida, se inmunizaron con 500 μ g de proteína emulsionada en CFA (Difco) o con IFA para inmunizaciones de refuerzo los días 24 y 48. El día 60, se tomó sangre de los conejos y se recuperó el suero para experimentos de inmunotransferencia o transferencia pasiva. Para la purificación de anticuerpos, se unió covalentemente His₆-Coa, His₆-vWbp o His₆-ClfA recombinante (5 mg) a columnas HP activadas por NHS HiTrap (GE Healthcare). Esta matriz de antígeno se usó después para cromatografía de afinidad de 10-20 ml de suero de conejo a 4 °C. La matriz cargada se lavó con 50 volúmenes de columna de PBS, los anticuerpos se eluyeron con tampón de elución (glicina 1 M pH 2,5, NaCl 0,5 M) y se neutralizaron inmediatamente con Tris-HCl 1 M (pH 8,5). Los anticuerpos purificados se dializaron durante una noche frente a PBS, NaCl 0,5 M a 4 °C.

Ensayo de coagulación Se diluyeron cultivos de una noche de cepas estafilocócicas 1:100 en TSB nuevo y se cultivaron a 37 °C hasta que alcanzaron una DO₆₀₀ 0,4. Se centrifugó un ml de cultivo y los estafilococos se lavaron y se suspendieron en 1 ml de PBS estéril para generar una suspensión de 1 x 10⁸ UFC/ml. Se recogió sangre completa de ratones BALB/c sin exposición previa y se añadió citrato de sodio a una concentración final de 1 % (p/v). Para evaluar la actividad de coagulación sanguínea bacteriana en presencia de anticuerpos, se mezclaron 10 μ l del cultivo bacteriano de reserva con 10 μ l de PBS que contenía 30 μ M de una mezcla de anti-Coa y anti-vWbp en un tubo de ensayo de plástico estéril (BD Falcon) y se incubaron durante quince minutos. A cada tubo, se añadieron 80 μ l de sangre de ratón anticoagulada en un tubo de ensayo de plástico estéril (BD falcon), para lograr una concentración final de 1 x 10⁷ UFC/ml. Los tubos de ensayo se incubaron a 37 °C y se verificó la coagulación de la sangre inclinando los tubos a ángulos de 45° a intervalos programados. Para experimentos con sangre humana, se tomaron muestras sanguíneas de 10 ml de individuos que dieron su consentimiento, que se trataron con citrato de sodio a una concentración final de 1 % (p/v). Después se analizó la sangre de la manera descrita anteriormente. Todos los experimentos se repitieron en al menos dos experimentos independientes.

Inmunización activa Ratones BALB/c de tres semanas de vida (n = 10), recibieron una inyección de 50 μ g de proteína emulsionada en 60 μ l de adyuvante incompleto de Freund y 40 μ l de adyuvante completo de Freund. Once días después de la vacunación, estos ratones se reforzaron con 50 μ g de proteína cada una emulsionada en 100 μ l de adyuvante incompleto de Freund. El día 21, los ratones se anestesiaron con ketamina/xilazina y se recogió sangre mediante sangrado retroorbital utilizando tubos capilares de microhematocrito (Fisher) en microtubos Z-Gel (Sarstedt) para determinar los títulos semimáximos. Los tubos se centrifugaron a 10.000 x g durante tres minutos y se recogió el suero. Los títulos de anticuerpos semimáximos se midieron mediante un ensayo inmunoabsorbente

ligado a enzimas (ELISA).

Transferencia pasiva de anticuerpos Seis horas antes de la infección, se inyectaron en ratones BALB/c de seis semanas de edad ($n = 10$) por vía intraperitoneal anticuerpos purificados por afinidad contra construcciones de longitud completa o de subdominio de Coa o vWbp o de V10 (IgG de control específica para el antígeno de la peste LcrV) a una dosis de 5 mg/kg de peso corporal.

Septicemia Se diluyeron cultivos de una noche de cepas estafilocócicas 1:100 en TSB nuevo y se cultivaron a hasta que alcanzaron una DO_{600} 0,4. Las bacterias se centrifugaron a 7.000 x g, se lavaron y se suspendieron en un décimo del volumen de PBS. Ratones hembra BALB/c de seis semanas de vida ($n = 15$) (Charles River), recibieron mediante inyección por vía retroorbital, suspensiones de 1×10^8 UFC (*S. aureus* Newman, N315, Cowan I y WIS), 5×10^7 UFC (*S. aureus* USA300) o 2×10^8 UFC (*S. aureus* MW2) en 100 μ l de PBS. Los ratones se supervisaron para determinar la supervivencia durante 10 días.

Absceso renal Se prepararon cepas de *S. aureus* como se describe para la septicemia pero, después del lavado, los sedimentos bacterianos se resuspendieron en un mismo volumen, lo que dio lugar a un log menos de UFC en comparación con la septicemia. Para enumerar la carga estafilocócica en el tejido renal cinco días después de la infección, los ratones se sacrificaron mediante asfixia con CO_2 y se extrajeron los riñones durante la necropsia. Se homogeneizó un riñón por ratón en PBS, Triton X-100 al 1 %. Se extendieron diluciones en serie de homogeneizado sobre TSA y se incubaron para la formación de colonias. La carga bacteriana en el tejido se analizó en comparaciones por pares entre cepas mutantes y de tipo silvestre con la prueba de t de Student de dos colas para datos independientes. Para histopatología, el riñón alternativo se fijó en formol al 10 % durante 24 horas a temperatura ambiente. Los tejidos se incluyeron en parafina, se cortaron en secciones delgadas, se tiñeron con hematoxilina y eosina y se examinaron mediante microscopia óptica para enumerar las lesiones patológicas por órgano. Los datos se analizaron en comparaciones por pares entre cepas mutantes y de tipo silvestre con la prueba de t de Student de dos colas para datos independientes.

Medición de la actividad coagulasa Se preincubó protrombina M 5×10^{-8} (Innovative Research) durante 10 minutos con una cantidad equimolar de Coa funcional a temperatura ambiente, seguido de la adición de S-2238 (un sustrato cromógeno) a una concentración final de 1 mM en un tampón de reacción total de 100 μ l de PBS. El cambio de la absorbancia se midió a 450 nm durante 10 minutos en un espectrofotómetro, se representó en función del tiempo y se ajustó a una curva lineal. La pendiente de la curva (dA/dt) se interpretó como la velocidad de hidrólisis de S-2238 y, por tanto, refleja la función enzimática. El ensayo se repitió en presencia de anticuerpos policlonales añadidos a 5×10^{-9} M y los datos se normalizaron con respecto a la actividad promedio sin inhibición. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Actividad coagulasa. Se mezclaron Coa o vWbp recombinante purificada (100 nM) con protrombina humana (Innovative Research) en citrato de sodio al 1 %/PBS. Después de una lectura inicial, se añadió fibrinógeno (3 μ M) (Sigma) y se midió la conversión de fibrinógeno en fibrina como un aumento de la turbidez a 450 nm en un lector de placas (BioTek) a intervalos de 2,5 minutos. Como controles, se midió la actividad enzimática de la alfa-trombina humana (Innovative Research) o de la protrombina sola.

Tabla de secuencias 1:

Dominios D1-2 de Coa de la cepa MRSA252:

IVTKDYSKES	RVNENSKYDT	PIPDWYLGSI	LNRLGDQIYY	AKELTNKYEY	50
GEKEYKQAI	D KLMTRVLGED	HYLLEKKKAQ	YEAYKKWF	EK HXSENPHSSL	100
KKIKFDDFDL	YRLTKKEYNE	LHQSLKEAVD	EFNSEVKNIQ	SKQKDLLPYD	150
EATENRVTNG	IYDFVCEIDT	LYAAYFNHSQ	YGHNAKELRA	KLDIILGDAK	200
DPVRITNERI	RKEMMDDLNS	IIDDDFFMDTN	MNRPLNITKF	NPNIHDYTNK	250
PENRDNFDKL	VKETREAIAN	ADESWKTRTV	KN (SEQ ID NO: 33)		

Dominios D1-2 de Coa de la cepa MW2:

IVTKDYSGKS	QVNAGSKNGK	QIADGYYWGI	IENLENQFYN	IFHLLDQHKY	50
AEKEYKDAVD	KLKTRVLEED	QYLLERKKEK	YEIYKELYKK	YKKENPNTQV	100
KMKAFFDKYDL	GDLTMEEYND	LSKLLTKALD	NFKLEVKKIE	SENPDLKPYS	150
ESEERTAYGK	IDSLVDQAYS	VYFAYVTDAQ	HKTEALNLRA	KIDLILGDEK	200
DPIRVTNQRT	EKEMIKDLES	IIDDDFFIETK	LNRPKHITRY	DGTHKHDIYKH	250
KDGFDAVKE	TREAVAKADE	SWKNKTVKK	(SEQ ID NO: 34)		

Dominios D1-2 de Coa de la cepa WIS:

IVTKDYSGKS	QVNAGSKNGK	QIADGYYWGI	IENLENQFYN	IFHLLDQHKY	50
AEKEYKDALD	KLKTRVLEED	QYLLERKKEK	YEIYKELYKK	YKKENPNTQV	100
KMKAFDKYDL	GDLTMEEYND	LSKLLTKALD	NFKLEVKKIE	SENPDLRPYS	150
ESEERTAYGK	IDSLVDQAYS	VYFAYVTDQA	HKTEALNLRA	KIDLILGDEK	200
DPIRVTNQRT	EKEMIKDLES	IIDDFFIETK	LNRPQHITRY	DGTHKHDYHKH	250
KDGFDAVKE	TREAVSKADE	SWKTKTVKK	(SEQ ID NO: 35)		

5

Dominios D1-2 de Coa de la cepa N315:

IVTKDYSKES	RVNEKSKKGA	TVSDYYYWKI	IDSLEAQFTG	AIDLLEDYKY	50
GDPIYKEAKD	RLMTRVLGED	QYLLKKKIDE	YELYKKWYKS	SNKNTNMLTF	100
HKYNLYNLTM	NEYNDIFNSL	KDAVYQFNKE	VKEIEHKNVD	LKQFDKDGED	150
KATKEVYDLV	SEIDTLVVTY	YADKDYGEHA	KELRAKLDLI	LGDTDNPHKI	200
TNERIKKEMI	DDLNSIIDDF	FMETKQNRPN	SITKYDPTKH	NFKEKSENKP	250
NFDKLVEETK	KAVKEADESW	KNKTVKK	(SEQ ID NO: 36)		

10

Dominios D1-2 de Coa de la cepa USA300:

IVTKDYSGKS	QVNAGSKNGT	LIDSRYLNSA	LYYLEDYIIY	AIGLTNKYEEY	50
GDNIYKEAKD	RLLEKVLRED	QYLLERKKSQ	YEDYQWYAN	YKKENPRTDL	100
KMANFHKYNL	EELSMKEYNE	LQDALKRALD	DFHREVVDIK	DKNSDLKTFN	150
AAEEDKATKE	VYDLVSEIDT	LVVSYYGDKD	YGEHAKELRA	KLDLILGDTD	200
NPHKITNERI	KKEMIDDLNS	IIDDFFMETK	QNRPKSITKY	NPTTHNYKTN	250
SDNKNPFDKL	VEETKKAVKE	ADDSWKKKT	KK (SEQ ID NO: 37)		

Tabla de secuencias n.º 2

15

Dominios D1-2 de vWbp de la cepa N315:

VVSGEKNPYV	SKALELKDKS	NKSNSYENYR	DSLESLISSL	SFADYKEYEE	50
PEYEKAVKKY	QQKFMAEDDA	LKNFLNEEEK	IKNADISRKS	NNLLGLTHER	100
YSYIFDTLKK	NKQEFKLDIE	EIQLKNSDLK	DFNNT (SEQ ID NO: 38)		

20

Dominios D1-2 de vWbp de la cepa MW2:

VVSGEKNPYV	SESLKLTNNK	NKSRTVEEYK	KSLDDLIWSF	PNLDNERFDN	50
PEYKEAMKKY	QQRFMAEDEA	LKKFFSEEKK	IKNGNTDNLD	YLGLSHERYE	100
SVFNTLKKQS	EEFLKEIEDI	KKDNPELKDF	NE (SEQ ID NO: 39)		

25

Dominios D1-2 Dominios L y Fgb de la cepa USA300

VVSGEKNPYV	SESLKLTNNK	NKSRTVEEYK	KSLDDLIWSF	PNLDNERFDN	50
PEYKEAMKKY	QQRFMAEDEA	LKKFFSEEKK	IKNGNTDNLD	YLGLSHERYE	100
SVFNTLKKQS	EEFLKEIEDI	KKDNPELKDF	NEEEQLKCDL	ELNKLENQIL	150
MLGKTFYQNY	RDDVESLYSK	LDLIMGYKDE	ERANKKAVNK	RMLNKKEDL	200
ETIIDEFFSD	IDKTRPNNIP	VLEDEKQEEK	NHKNMAQLKS	DTEAAKSDS	250
KRSKRKRSL	NTQNHKPASQ	EVSEQQKAEY	DKRAEERKAR	FLDNQKIKKT	300
PVVSLEYDFE	HKQRIDNEND	KKLVVSAPTK	KPTSPTTYTE	TTTQVPMPTV	350
ERQTQQQIIY	NAPKQLAGLN	GESHDFTTTH	QSPTTSNHTH	NNVVEFEETS	400
ALPGRKSGSL	VGISQIDSSH	LTEREKRVIK	REHVREAQKL	VDNYKDTHSY	450
KDRINAQQKV	NTLSEGHQKR	FNKQINKVYN	GK (SEQ ID NO: 40)		

Secuencias adicionales:

Dominios D1-2 y L de Coa de la cepa N315:

5

IVTKDYSKES	RVNEKSKKGA	TVSDYYYWKI	IDSLEAQFTG	AIDLLEDYKY	50
GDPIYKEAKD	RLMTRVLGED	QYLLKKKIDE	YELYKKWYKS	SNKNTNMLTF	100
HKYNLYNLTM	NEYNDIFNSL	KDAVYQFNKE	VKEIEHKNVD	LKQFDKDGED	150
KATKEVYDLV	SEIDTLVVTY	YADKDYGEHA	KELRAKLDLI	LGDTDNPHKI	200
TNERIKKEMI	DDLNSIIDDF	FMETKQNRPN	SITKYDPTKH	NFKEKSENKP	250
NFDKLVEETK	KAVKEADESW	KNKTVKKYEE	TVTKSPVVKE	EKKVEEPQLP	300
KVGNQQEVKT	TAGKAEETTQ	PVAQPLVKIP	QETIYGETVK	GPEYPTMENK	350
TLQGEIVQGP	DFLTMEQNRP	SLSDNYTQPT	TPNPILEGLE	GSSSKLEIKP	400
QGTESTLKG	QGESSDIEVK	PQATETTEAS	QYGP (SEQ ID NO: 41)		

Polipéptido de Coa de longitud completa:
Cepa USA300

10

MKKQIISLGA	LAVASSLFTW	DNKADAIVTK	DYSGKSQVNA	GSKNGTLIDS	50
RYLNSALYYL	EDYIIYAIGL	TNKYEYGDNI	YKEAKDRLE	KVLREDQYLL	100
ERKKSQYEDY	KQWYANYKKE	NPRTDLKMAN	FHKYNLEELS	MKEYNELQDA	150
LKRALDDFHR	EVKDIKDKNS	DLKTFNAEE	DKATKEVYDL	VSEIDTLVVS	200
YYGDKDYGEH	AKELRAKLDL	ILGDTDNPHK	ITNERIKKEM	IDDLNSIIDD	250
FFMETKQNRP	KSITKYNPTT	HNYKTNSDNK	PNFDKLVEET	KKAVKEADDS	300
WKKKTVMKKY	ETETKSPVVK	EEKKVEEPQA	PKVDNQQEVK	TTAGKAEETT	350
QPVAQPLVKI	PQGTITGEIV	KGPEYPTMEN	KTVQGEIVQG	PDFLTMEQSG	400
PSLSNNYTNP	PLTNPILEGL	EGSSSKLEIK	PQGTESTLKG	TQGESSDIEV	450
KPQATETTEA	SQYGPRPQFN	KTPKYVKYRD	AGTGIREYND	GTFGYEARPR	500
FNKPSETNAY	NVTTHANGQV	SYGARPTQNK	PSKTNAYNVT	THGNGQVSYG	550
ARPTQNKPSK	TNAYNVTTHA	NGQVSYGARP	TYKKPSKTNA	YNVTTHADGT	600
ATYGPRVTK	(SEQ ID NO: 42)				

Secuencias adicionales de ácido nucleico de COA (se indican los dominios)

15 USA300

D1-

ATAGTAACAAAGGATTATAGTGGGAAATCACAAGTTAATGCTGGGAGTAAAAATGGG
ACATTAATAGATAGCAGATATTTAAATTCAGCTCTATATTATTTGGAAGACTATATAATTTA
TGCTATAGGATTAACTAATAAATATGAATATGGAGATAATATTTATAAAGAAGCTAAAGATA
GGTTGTTGGAAAAGGTATTAAGGGAAGATCAATATCTTTTGGAGAGAAAGAAATCTCAATAT
GAAGATTATAAACAATGGTATGCAAATTATAAAAAAGAAAATCCTCGTACAGATTTAAAAAT
GGCTAATTTTCATAAATATAATTTAGAAGAACTTTTCGATGAAAGAATACAATGAACTACAGG
ATGCATTAAAGAGAGCACTGGATGATTTTTCACAGAGAAGTTAAAGATATTAAGGATAAGAAT
TCAGACTTGAAAACCTTTT (SEQ ID NO: 43)

D2-

AATGCAGCAGAAGAAGATAAAGCAACTAAGGAAGTATACGATCTCGTATCTGAAATT
GATACATTAGTTGTATCATATTATGGTGATAAGGATTATGGGGAGCACGCGAAAGAGTTACG
AGCAAACTGGACTTAATCCTTGGAGATACAGACAATCCACATAAAATTACAAATGAACGTA
TTAAAAAAGAAATGATTGATGACTTAAATTCAATTATTGATGATTTCTTTATGGAACTAAA
CAAAATAGACCGAAATCTATAACGAAATATAATCCTACAACACATAACTATAAAACAAATAG
TGATAATAAACCTAATTTTGATAAATTAGTTGAAGAAACGAAAAAAGCAGTTAAAGAAGCAG
ATGATTCTTGAAAAAGAAAACGTCAAAAAA (SEQ ID NO: 44)

L-

TACGGAGAACTGAAACAAAATCGCCAGTAGTAAAAGAAGAGAAGAAAGTTGAAGAA
CCTCAAGCACCTAAAGTTGATAACCAACAAGAGGTTAAACTACGGCTGGTAAAGCTGAAGA
AACAACACAACCAGTTGCACAACCATTAGTTAAAATTCCACAGGGCACAATTACAGGTGAAA
TTGTAAAAGGTCCGGAATATCCAACGATGGAAAATAAAACGGTACAAGGTGAAATCGTTCAA
GGTCCCGATTTTCTAACAATGGAACAAAGCGGCCCATCATTAAAGCAATAATTATACAAACCC
ACCGTTAACGAACCCTATTTTAGAAGGTCTTGAAGGTAGCTCATCTAACTTGAAATAAAAC
CACAAGGTACTGAATCAACGTTAAAAGGTACTCAAGGAGAATCAAGTGATATTGAAGTTAAA
CCTCAAGCAACTGAAACAAACAGAAGCTTCTCAATATGGTCCG (SEQ ID NO: 45)

R-

AGACCGCAATTTAACAAAACACCTAAATATGTTAAATATAGAGATGCTGGTACAGGTATCCG
TGAATACAACGATGGAACATTTGGATATGAAGCGAGACCAAGATTCAATAAGCCATCAGAAA
CAAATGCATATAACGTAACAACACATGCAAATGGTCAAGTATCATACGGAGCTCGTCCGACA
CAAAACAAGCCAAGCAAAACAAACGCATATAACGTAACAACACATGGAAACGGCCAAGTATC
ATATGGCGCTCGCCCAACACAAAACAAGCCAAGCAAAACAAATGCATACAACGTAACAACAC
ATGCAAACGGTCAAGTGTCATACGGAGCTCGCCCGACATACAAGAAGCCAAGTAAACAAAT
GCATACAATGTAACAACACATGCAGATGGTACTGCGACATATGGGCCTAGAGTAACAAAATA
A (SEQ ID NO: 46)

N315

5 D1-

ATGAAAAAGCAAATAATTTTCGCTAGGCGCATTAGCAGTTGCATCTAGCTTATTTACA
TGGGATAACAAAGCAGATGCGATAGTAACAAAGGATTATAGTAAAGAATCAAGAGTGAATGA
GAAAAGTAAAAAGGGAGCTACTGTTTCAGATTATTACTATTGGAAAATAATTGATAGTTTAG
AGGCACAATTTACTGGAGCAATAGACTTATTGGAAGATTATAAATATGGAGATCCTATCTAT
AAAGAAGCGAAAGATAGATTGATGACAAGAGTATTAGGAGAAGACCAGTATTTATTAAAGAA
AAAGATTGATGAATATGAGCTTTATAAAAAGTGGTATAAAAGTTCAAATAAGAACACTAATA
TGCTTACTTTCCATAAATATAATCTTTACAATTTAACAATGAATGAATATAACGATATTTTT
AACTCTTTGAAAGATGCAGTTTATCAATTTAATAAAGAAGTTAAAGAAATAGAGCATAAAAA
TGTTGACTTGAAGCAGTTT (SEQ ID NO: 47)

10 D2-

GATAAAGATGGAGAAGACAAGGCAACTAAAGAAGTTTATGACCTTGTTTCTGAAATT
GATACATTAGTTGTAACCTTATTATGCTGATAAGGATTATGGGGAGCATGCGAAAGAGTTACG
AGCAAAACTGGACTTAATCCTTGAGATACAGACAATCCACATAAAATTACAAATGAGCGTA
TAAAAAAAGAAATGATCGATGACTTAAATTCAATTATAGATGATTTCTTTATGGGAGACTAAA
CAAAATAGACCGAATTCTATAACAAAATATGATCCAACAAAACACAATTTTAAAGAGAAGAG
TGAAAATAAACCTAATTTTGATAAATTAGTTGAAGAAACAAAAAAGCAGTTAAAGAAGCAG
ACGAATCTTGAAAAATAAACTGTCAAAAAA (SEQ ID NO: 48)

L-

TACGAGGAAACTGTAACAAAATCTCCTGTTGTAAAAGAAGAGAAGAAAGTTGAAGAA
CCTCAATTACCTAAAGTTGGAAACCAGCAAGAGGTTAAAACCTACGGCTGGTAAAGCTGAAGA
AACAACACAACCAGTGGCACAGCCATTAGTAAAAATTCCACAAGAAACAATCTATGGTGAAA
CTGTAAAAGGTCCAGAATATCCAACGATGGAAAATAAAACGTTACAAGGTGAAATCGTTCAA
GGTCCCGATTTTCTAACAATGGAACAAAACAGACCATCTTTAAGCGATAATTATACTCAACC
GACGACACCGAACCCCTATTTTAGAAGGTCTTGAAGGTAGCTCATCTAACTTGAAATAAAAC
CACAAGGTACTGAATCAACGTTGAAAGGTATTCAAGGAGAATCAAGTGATATTGAAGTTAAA
CCTCAAGCAACTGAAACAACAGAAGCTTCTCAATATGGTCCG (SEQ ID NO: 49)

R-

AGACCGCAATTTAACAAAACACCTAAGTATGTGAAATATAGAGATGCTGGTACAGGT
ATCCGTGAATACAACGATGGAACATTTGGATATGAAGCGAGACCAAGATTCAACAAGCCAAG
TGAAACAAATGCATACAACGTAACGACAAATCAAGATGGCACAGTATCATACGGAGCTCGCC
CAACACAAAACAAGCCAAGTGAAACAAACGCATATAACGTAACAACACATGCAATGGTCAA
GTATCATACGGTGCTCGCCCAACACAAAAAAAGCCAAGCAAAACAAATGCATACAACGTAAC
AACACATGCAATGGTCAAGTATCATATGGCGCTCGCCCGACACAAAAAAAGCCAAGCAAAA
CAAATGCATATAACGTAACAACACATGCAATGGTCAAGTATCATACGGAGCTCGCCCGACA
TACAAGAAGCCAAGCGAAACAAATGCATACAACGTAACAACACATGCAATGGTCAAGTATC
ATATGGCGCTCGCCCGACACAAAAAAAGCCAAGCGAAACAAACGCATATAACGTAACAACAC
ATGCAGATGGTACTGCGACATATGGGCCTAGAGTAACAAAATAA (SEQ ID NO: 50)

5

Cepa MW2

D1-

10

ATGAAAAAGCAAATAATTTTCGCTAGGCGCATTAGCAGTTGCATCTAGCTTATTTACA
TGGGATAACAAAGCAGATGCGATAGTAACAAAGGATTATAGTGGGAAATCACAAGTTAATGC
TGGGAGTAAAAATGGGAAACAAATTGCAGATGGATATTATTGGGGAATAATTGAAAATCTAG
AAAACCAGTTTTACAATATTTTTTCATTTACTGGATCAGCATAAATATGCAGAAAAAGAATAT
AAAGATGCAGTAGATAAATTA AAAACTAGAGTTTTAGAGGAAGACCAATACCTGCTAGAAAG
AAAAAAAGAAAAATACGAAATTTATAAAGAACTATATAAAAAATACAAAAAAGAGAATCCTA
ATACTCAAGTTAAAATGAAAGCATTTGATAAATACGATCTTGGCGATTTAACTATGGAAGAA
TACAATGACTTATCAAAATTATTAACAAAAGCATTGGATAACTTTAAGTTAGAAGTAAAGAA
AATTGAATCAGAGAATCCAGATTTAAAACCATAT (SEQ ID NO: 51)

D2-

TCTGAAAGCGAAGAAAGAACAGCATATGGTAAAATAGATTCACTTGTTGATCAAGCATATAG
TGTATATTTTGCCTACGTTACAGATGCACAACATAAAACAGAAGCATTAAATCTTAGGGCGA
AAATTGATTTGATTTTAGGTGATGAAAAAGATCCAATTAGAGTTACGAATCAACGTACTGAA
AAAGAAATGATTAAAGATTTAGAATCTATTATTGATGATTTCTTCATTGAAACCAAGTTGAA
TAGACCTAAACACATTACTAGGTATGATGGAACATAACATGATTACCATAAACATAAAGATG
GATTTGATGCTCTAGTTAAAGAAACAAGAGAAGCGGTTGCAAAGGCTGACGAATCTTGAAA
AATAAACTGTCAAAAAA (SEQ ID NO: 52)

L-

TACGAGGAAACTGTAACAAAATCTCCAGTTGTAAAAGAAGAGAAGAAAGTTGAAGAA
CCTCAATCACCTAAATTTGATAACCAACAAGAGGTTAAAATTACAGTTGATAAAGCTGAAGA
AACAACACAACCAGTGGCACAGCCATTAGTTAAAATTCCACAGGGCACAATTACAGGTGAAA
TTGTAAAAGGTCCGGAATATCCAACGATGGAAAATAAAACGTTACAAGGTGAAATCGTTCAA
GGTCCAGATTTCCCAACAATGGAACAAAACAGACCATCTTTAAGCGATAATTATACTCAACC
GACGACACCGAACCCCTATTTTAGAAGGTCTTGAAGGTAGCTCATCTAACTTGAAATAAAAC
CACAAGGTACTGAATCAACGTTAAAAGGTACTCAAGGAGAATCAAGTGATATTGAAGTTAAA
CCTCAAGCATCTGAAACAACAGAAGCATCACATTATCCAGCAAGACCTCAATTTAACAAAAC
ACCTAAATATGTTAAATATAGAGATGCTGGTACAGGTATCCGTGAATACAACGATGGAACAT
TTGGATATGAA (SEQ ID NO: 53)

R-

GCGAGACCAAGATTCAATAAGCCATCAGAAACAAACGCATACAACGTAACGACAAATCAAGA
TGGCACAGTAACATATGGCGCTCGCCCAACACAAAACAAACCAAGCAAAACAAATGCATACA
ACGTAACAACACATGCAAATGGTCAAGTATCATATGGCGCTCGCCCGACACAAAACAAGCCA
AGCAAAACAAATGCATATAACGTAACAACACATGCAAATGGTCAAGTATCATACGGAGCTCG
CCCGACACAAAACAAGCCAAGCAAAACAAATGCATATAACGTAACAACACACGCAACGGTC
AAGTGTCTACGAGCTCGCCCGACATACAAGAAGCCAAGTAAAACAAATGCATACAATGTA
ACAACACATGCAGATGGTACTGCGACATATGGGCCTAGAGTAACAAAATAA (SEQ ID
NO: 54)

Cepa MRSA252

D1-

ATGAAAAAGCAAATAATTTTCGCTAGGCGCATTAGCAGTTGCATCTAGCTTATTTACATGGGA
TAACAAAGCAGATGCGATAGTAACTAAAGATTATAGTAAAGAATCAAGAGTGAATGAGAACA
GTAAATACGATACACCAATTCCAGATTGGTATCTAGGTAGTATTTTAAACAGATTAGGGGAT
CAAATATACTACGCTAAGGAATTAATAATAACGAATATGGTGAGAAAGAGTATAAGCA
AGCGATAGATAAATTGATGACTAGAGTTTTGGGAGAAGATCATTATCTATTAGAAAAAAGA
AAGCACAATATGAAGCATACAAAAATGGTTTGAAAAACATAAAAGTGAAAATCCACATTCT
AGTTTAAAAAAGATTAAATTTGACGATTTTGATTTATATAGATTAACGAAGAAAGAATACAA
TGAGTTACATCAATCATTAAAGAAGCTGTTGATGAGTTTAATAGTGAAGTGAAAAATATTC
AATCTAAACAAAAGGATTTATTACCTTAT (SEQ ID NO: 55)

D2-

GATGAAGCAACTGAAAATCGAGTAACAAATGGAATATATGATTTTGTTTGCGAGATTGACAC
ATTATACGCAGCATATTTTAATCATAGCCAATATGGTCATAATGCTAAAGAATTAAGAGCAA
AGCTAGATATAATTCTTGGTGATGCTAAAGATCCTGTTAGAATTACGAATGAAAGAATAAGA
AAAGAAATGATGGATGATTTAAATTCTATTATTGATGATTTCTTTATGGATACAAACATGAA
TAGACCATTAACATAACTAAATTTAATCCGAATATTCATGACTATACTAATAAGCCTGAAA
ATAGAGATAACTTCGATAAATTAGTCAAAGAAACAAGAGAAGCAATCGCAAACGCTGACGAA
TCTTGGAACAAGAACCGTCAAAAAT (SEQ ID NO: 56)

L-

TACGGTGAATCTGAAACAAAATCTCCTGTTGTAAAAGAAGAGAAGAAAGTTGAAGAACCTCA
ATTACCTAAAGTTGGAACCAGCAAGAGGATAAAATTACAGTTGGTACAACTGAAGAAGCAC
CATTACCAATTGCGCAACCACTAGTTAAAATTCCACAGGGCACAATTCAAGGTGAAATTGTA
AAAGGTCCGGAATATCTAACGATGGAAAATAAACGTTACAAGGTGAAATCGTTCAAGGTCC
AGATTTCCCAACAATGGAACAAAACAGACCATCTTTAAGCGATAATTATACTCAACCGACGA
CACCGAACCTATTTTAAAAGGTATTGAAGGAACTCAACTAACTTGAAATAAAACCACAA
GGTACTGAATCAACGTTAAAAGGTACTCAAGGAGAATCAAGTGATATTGAAGTTAAACCTCA
AGCAACTGAAACAACAGAAGCATCACATTATCCAGCGAGACCTCAATTTAACAAAACACCTA
AGTATGTGAAATATAGAGATGCTGGTACAGGTATCCGTGAATACAACGATGGAACATTTGGA
TATGAA (SEQ ID NO: 57)

R-

GCGAGACCAAGATTCAACAAGCCAAGCGAAACAAATGCATACAACGTAACGACAAATCAAGA
TGGCACAGTATCATATGGCGCTCGCCCGACACAAAACAAGCCAAGCGAAACAAACGCATATA
ACGTAACAACACATGCAAACGGCCAAGTATCATACGGAGCTCGTCCGACACAAAACAAGCCA
AGCGAAACGAACGCATATAACGTAACAACACATGCAAACGGTCAAGTGTTCATACGGAGCTCG
CCCAACACAAAACAAGCCAAGTAAAACAAATGCATACAATGTAACAACACATGCAGATGGTA
CTGCGACATATGGTCCTAGAGTAACAAAATAA (SEQ ID NO: 58)

Cepa WIS

5 D1-

ATAGTAACAAAGGATTATAGTGGGAAATCACAAGTTAATGCTGGGAGTAAAAATGGG
AAACAAATTGCAGATGGATATTATTGGGGAATAATTGAAAATCTAGAGAACCAGTTTTACAA
TATTTTTTCATTTATTGGATCAGCATAAATATGCAGAAAAAGAATATAAAGATGCATTAGATA
AATTAAAACTAGAGTTTTAGAGGAAGACCAATACCTGCTAGAAAGAAAAAAGAAAAATAC
GAAATTTATAAAGAACTATATAAAAAATACAAAAAAGAGAATCCTAATACTCAGGTAAAAAT
GAAAGCATTTGATAAATACGATCTTGGCGATTTTAACTATGGAAGAATACAATGACTTATCAA
AATTATTAACAAAAGCATTGGATAACTTTAAGTTAGAAGTAAAGAAAATTGAATCAGAGAAT
CCAGATTTAAGACCATAT (SEQ ID NO: 59)

10 D2-

TCTGAAAGTGAAGAGAGAACAGCATATGGTAAAATAGATTCACTTGTTGATCAAGCATATAG
TGTATATTTTGCCTACGTTACAGATGCTCAACATAAAACAGAAGCATTAAATCTTAGGGCAA
AAATAG**G**ATTT**G**ATTTTAGGT**G**AT**G**AAAA**G**ATCCAATTAG**G**AT**G**AC**G**AATCAACGTACT**G**AA
AA**G**AAT**G**ATTAAAGATTTAGAATCTATTATTGATGATTTCTTCATTGAAACAAAGTTGAA
TAGACCTCAACACATTACTAGATATGATGGAACATAACATGATTACCATAAACATAAAGATG
GATTTGATGCTTTAGTTAAAGAAACAAGAGAAGCGGTTTCTAAGGCTGACGAATCTTGGA
ACTAAACTGTCAAAAAA (SEQ ID NO: 60)

L-

TACGGGGAAACTGAAACAAAATATCCTGTTGTAAAAGAAGAGAAGAAAGTTGAAGAACCTCA
ATCACCTAAAGTTTCTGAAAAAGTGGATGTTTCAGGAAACGGTTGGTACAACCTGAAGAAGCAC
CATTACCAATTGCGCAACCACTAGTTAAATTACCACAAATTGGGACTCAAGGCGAAATTGTA
AAAGGTCCCGACTATCCAACCTATGGAAAATAAAACGTTACAAGGTGTAATTGTTCAAGGTCC
AGATTTCCCAACAATGGAACAAAACAGACCATCTTTAAGTGACAATTATACACAACCATCTG
TGACTTTACCGTCAATTACAGGTGAAAGTACACCAACGAACCCCTATTTTAAAAGGTATTGAA
GGAAACTCATCTAAACTTGAAATAAAACCACAAGGTACTGAATCAACGTTGAAAGGTATTCA
AGGAGAATCAAGTGATATTGAAGTTAAACCTCAAGCAACTGAAACAACAGAAGCATCACATT
ATCCAGCGAGACCGCAATTTAACAAAACACCTAAATATGTGAAATATAGAGATGCTGGTACA
GGTATTCGTGAATACAACGATGGAACTTTTGGATATGAA (SEQ ID NO: 61)

R-

GCGAGACCAAGATTCAACAAGCCATCAGAAACAAACGCATACAACGTAACGACAAATCAAGA
TGGCACAGTATCATATGGGGCTCGCCCAACACAAAACAAGCCAAGCAAAACAAATGCATATA
ACGTAACAACACATGCAAACGGCCAAGTATCATATGGCGCTCGCCCGACATACAACAAGCCA
AGTGAAACAAATGCATACAACGTAACGACAAATCGAGATGGCACAGTATCATATGGCGCTCG
CCCGACACAAAACAAGCCAAGCGAAACGAATGCATATAACGTAACAACACACGGAAATGGCC
AAGTATCATATGGCGCTCGTCCGACACAAAAGAAGCCAAGCAAAACAAATGCATATAACGTA
ACAACACATGCAAACGGCCAAGTATCATATGGCGCTCGTCCGACATACAACAAGCCAAGTAA
AACAAATGCATACAATGTAACAACACATGCAGATGGTACTGCGACATATGGTCCTAGAGTAA
CAAAATAA (SEQ ID NO: 62)

5

MU50

D1-

10

GATTGGGCAATTACATTTTGGAGGAATTAAAAAATTATGAAAAAGCAAATAATTTTCGCTAGG
CGCATTAGCAGTTGCATCTAGCTTATTTACATGGGATAACAAAGCAGATGCGATAGTAACAA
AGGATTATAGTAAAGAATCAAGAGTGAATGAGAAAAGTAAAAAGGGAGCTACTGTTTCAGAT

TATTACTATTGGAAAATAATTGATAGTTTAGAGGCACAATTTACTGGAGCAATAGACTTATT
GGAAGATTATAAATATGGAGATCCTATCTATAAAGAAGCGAAAGATAGATTGATGACAAGAG
TATTAGGAGAAGACCAGTATTTATTAAAGAAAAAGATTGATGAATATGAGCTTTATAAAAAG
TGGTATAAAAGTTCAAATAAGAACACTAATATGCTTACTTTCCATAAATATAATCTTTACAA
TTTAACAATGAATGAATATAACGATATTTTTAACTCTTTGAAAGATGCAGTTTATCAATTTA
ATAAAGAAGTTAAAGAAATAGAGCATAAAAAATGTTGACTTGAAGCAGTTT (SEQ ID NO:
63)

D2-

GATAAAGATGGAGAAGACAAGGCAACTAAAGAAGTTTATGACCTTGTTTCTGAAATT
GATACATTAGTTGTAACCTTATTATGCTGATAAGGATTATGGGGAGCATGCGAAAGAGTTACG
AGCAAAACTGGACTTAATCCTTGGAGATACAGACAATCCACATAAAATTACAAATGAGCGTA
TAAAAAAGAAATGATCGATGACTTAAATTCAATTATAGATGATTTCTTTATGGAGACTAAA
CAAAATAGACCGAATTCTATAACAAAATATGATCCAACAAAACACAATTTTAAAGAGAAGAG
TGAAAATAAACCTAATTTTGATAAATTAGTTGAAGAAACAAAAAAGCAGTTAAAGAAGCAG
ACGAATCTTGAAAAATAAACTGTCAAAAAA (SEQ ID NO: 64)

L-

TACGAGGAAACTGTAACAAAATCTCCTGTTGTAAAAGAAGAGAAGAAAGTTGAAGAACCTCA
ATTACCTAAAGTTGGAAACCAGCAAGAGGTTAAAACCTACGGCTGGTAAAGCTGAAGAAACAA
CACAACCAGTGGCACAGCCATTAGTAAAAATTCCACAAGAAACAATCTATGGTGAAACTGTA
AAAGGTCCAGAATATCCAACGATGGAAAATAAAACGTTACAAGGTGAAATCGTTCAAGGTCC
CGATTTTCTAACAATGGAACAAAACAGACCATCTTTAAGCGATAATTATACTCAACCGACGA
CACCGAACCTTATTTTAGAAGGTCTTGAAGGTAGCTCATCTAACTTGAAATAAAACCACAA
GGTACTGAATCAACGTTGAAAGGTATTCAAGGAGAATCAAGTGATATTGAAGTTAAACCTCA
AGCAACTGAAACAACAGAAGCTTCTCAATATGGTCCG (SEQ ID NO: 65)

R-

AGACCGCAATTTAACAAAACACCTAAGTATGTGAAATATAGAGATGCTGGTACAGGTATCCG
TGAATACAACGATGGAACATTTGGATATGAAGCGAGACCAAGATTCAACAAGCCAAGTGAAA
CAAATGCATACAACGTAACGACAAATCAAGATGGCACAGTATCATACGGAGCTCGCCCAACA
CAAAACAAGCCAAGTGAAACAAACGCATATAACGTAACAACACATGCAAATGGTCAAGTATC
ATACGGTGCTCGCCCAACACAAAAAAGCCAAGCAAAACAAATGCATACAACGTAACAACAC
ATGCAAATGGTCAAGTATCATATGGCGCTCGCCCGACACAAAAAAGCCAAGCAAAACAAAT
GCATATAACGTAACAACACATGCAAATGGTCAAGTATCATACGGAGCTCGCCCGACATACAA
GAAGCCAAGCGAAACAAATGCATACAACGTAACAACACATGCAAATGGTCAAGTATCATATG
GCGCTCGCCCGACACAAAAAAGCCAAGCGAAACAAACGCATATAACGTAACAACACATGCA
GATGGTACTGCGACATATGGGCCTAGAGTAACAAAATAA (SEQ ID NO: 66)

85/2082

5 D1-

ATAGTAACTAAAGATTATAGTAAAGAATCAAGAGTGAATGAGAACAGTAAATACGATACACC
AATTCCAGATTGGTATCTAGGTAGTATTTTAAACAGATTAGGGGATCAAATATACTACGCTA
AGGAATTAATAATAATACGAATATGGTGAGAAAGAGTATAAGCAAGCGATAGATAAATTG
ATGACTAGAGTTTTGGGAGAAGATCATTATCTATTAGAAAAAAGAAAGCACAATATGAAGC
ATACAAAAAATGGTTTGAAAAACATAAAAGTGAAAATCCACATTCTAGTTTAAAAAAGATTA
AATTTGACGATTTTGATTTATATAGATTAAACGAAGAAAGAATACAATGAGTTACATCAATCA
TTAAAAGAAGCTGTTGATGAGTTTAAATAGTGAAAGTGAAAAATATTCAATCTAAACAAAAGGA
TTTATTACCTTAT (SEQ ID NO: 67)

10 D2-

GATGAAGCAACTGAAAATCGAGTAACAAATGGAATATATGATTTTGTGCGAGATTGACAC
ATTATACGCAGCATATTTTAATCATAGCCAATATGGTCATAATGCTAAAGAATTAAGAGCAA
AGCTAGATATAATTCTTGGTGATGCTAAAGATCCTGTTAGAATTACGAATGAAAGAATAAGA
AAAGAAATGATGGATGATTTAAATTCTATTATTGATGATTTCTTTATGGATACAAACATGAA
TAGACCATTAACATAACTAAATTTAATCCGAATATTCATGACTATACTAATAAGCCTGAAA
ATAGAGATAACTTCGATAAATTAGTCAAAGAAACAAGAGAAGCAGTCGAAACGCTGACGAA
TCTTGAAAACAAGAACCGTCAAAAAT (SEQ ID NO: 68)

L-

TACGGTGAATCTGAAACAAAATCTCCTGTTGTAAAAGAAGAGAAGAAAGTTGAAGAACCTCA
ATTACCTAAAGTTGGAAACCAGCAAGAGGATAAAATTACAGTTGGTACAACCTGAAGAAGCAC
CATTACCAATTGCGCAACCACTAGTTAAAATTCCACAGGGCACAATTCAAGGTGAAATTGTA
AAAGGTCCGGAATATCTAACGATGGAAAATAAAACGTTACAAGGTGAAATCGTTCAAGGTCC
AGATTTCCCAACAATGGAACAAAACAGACCATCTTTAAGCGATAATTATACTCAACCGACGA
CACCGAACCTATTTTAAAAGGTATTGAAGGAACTCAACTAACTTGAAATAAAACCACAA
GGTACTGAATCAACGTTAAAAGGTACTCAAGGAGAATCAAGTGATATTGAAGTTAAACCTCA
AGCAACTGAAACAACAGAAGCATCACATTATCCAGCGAGACCTCAATTTAACAAAACACCTA
AGTATGTGAAATATAGAGATGCTGGTACAGGTATCCGTGAATACAACGATGGAACATTTGGA
TATGAA (SEQ ID NO: 69)

R-

GCGAGACCAAGATTCAACAAGCCAAGCGAAACAAATGCATACAACGTAACGACAAATCAAGA
TGGCACAGTATCATATGGCGCTCGCCCGACACAAAACAAACCAAGCGAAACAAATGCATACA
ACGTAACAACACATGCAAACGGCCAAGTATCATATGGCGCCCGCCCAACATACAAGAAGCCA
AGCGAAACAAACGCATACAACGTAACGACAAATCAAGATGGCACAGTATCATATGGCGCTCG
CCCGACACAAAACAAGCCAAGCGAAACAAACGCATATAACGTAACAACACATGCAAACGGCC
AAGTATCATACGGAGCTCGTCCGACACAAAACAAGCCAAGCGAAACGAACGCATATAACGTA
ACAACACATGCAAACGGTCAAGTGTCATACGGAGCTCGCCCAACACAAAACAAGCCAAGTAA
AACAAATGCATACAATGTAACAACACATGCAGATGGTACTGCGACATATGGTCCTAGAGTAA
CAAATAA (SEQ ID NO: 70)

5

Newman

D1-

10

atgaaaaagcaaataatctcgctagggcgcattagcagttgcatctagcttatttacatggga
taacaaagcagatgcatagtaacaaaggattatagtgggaaatcacaaagttaatgctggga
gtaaaaatgggacattaatagatagcagatatttaaattcagctctatattatttggagac
tatataatttatgctataggattaactaataaatatgaatatggagataatatttataaaga
agctaaagataggttggttgaaaaaggtattaagggaagatcaatatcttttggagagaaaga
aatctcaatatgaagattataaacaatggtatgcaaattataaaaaagaaaatcctcgtaca
gatttaaaaatggctaattttcataaatataatttagaagaactttcgtatgaaagaatacaa
tgaactacaggatgcattaaagagagcactggatgattttcacagagaagttaaagatatta
aggataagaattcagacttgaaaactttt (SEQ ID NO: 71)

D2-

aatgcagcagaagaagataaagcaactaaggaagtatacgatctcgtatctgaaattgatac
attagttgtatcatattatgggtgataaggattatggggagcacgcgaaagagttacgagcaa
aactggacttaatccttggagatacagacaatccacataaaattacaaatgaacgtattaaa
aaagaaatgattgatgacttaaatcaattattgatgatttctttatggaaactaaacaaaa
tagaccgaaatctataacgaaatataatcctacaacacataactataaaacaaatagtata
ataaacctaattttgataaattagttgaagaaacgaaaaaagcagttaaagaagcagatgat
tcttggaaaaagaaaactgtcaaaaaa (SEQ ID NO: 72)

L-

tacggagaaactgaaacaaaatcgccagtagtaaaagaagagaagaaagttgaagaacctca
agcacctaaagttgataaccaacaagaggttaaaactacggctggtaagctgaagaaacaa
cacaaccagttgcacaaccattagttaaaattccacagggcacaattacaggtgaaattgta
aaaggtccggaatatccaacgatggaaaataaaacggtacaaggtgaaatcgttcaaggtcc
cgattttctaacaatggaacaaagcggcccatcattaagcaataattatacaaaccaccgt
taacgaaccctattttagaaggtcttgaaggtagctcatctaaacttgaaataaaaccacaa
ggtagtgaatcaacgtttaaaggtactcaaggagaatcaagtgatattgaagttaaacctca
agcaactgaaacaacagaagcttctcaatatggtccg (SEQ ID NO: 73)

R-

agaccgcaattttaacaaaacacctaataatgtttaatatagagatgctggtacaggtatccg
tgaataacaacgatggaacatttggatatgaagcgagaccaagattcaataagccatcagaaa
caaatgcatataacgtaacaacacatgcaaattggtcaagtatcatatcgagctcggtccgaca
tacaagaagccaagcgaaacgaatgcatacaatgtaacaacacatgcaaacggccaagtatc
atacggagctcggtccgacacaaaacaagccaagcaaaacaaacgcatataacgtaacaacac
atggaaacggccaagtatcatatggcgctcgcccaacacaaaacaagccaagcaaaacaaat
gcatacaacgtaacaacacatgcaaacggtcaagtgtcatatcgagctcgcccgacatacaa
gaagccaagtaaaaacaaatgcatacaatgtaacaacacatgcagatggtactgcgacatatg
ggcctagagtaacaaaataa (SEQ ID NO: 74)

Polipéptido de vWbp de longitud completa de la cepa USA 300

mknkllvls	galcvsqiwe	snrasavvsg	eknpyvsesl	kltnnknksr
tveeykksld	dliwsfpnld	nerfdnpeyk	eamkkyqqr	maedealkkf
fseekkikng	ntdnldylgl	sheryesvfn	tlkkqseefl	keiedikkdn
pelkdfneee	qlkcdlelnk	lenqilmlgk	tfyqnyrddv	eslyskldli
mgykdeeran	kkavnkrml	nkkeletii	deffsdiidk	rpnnipvled
ekqeeknhkn	maqlksdtea	aksdeskrsk	rskrslnltn	hkpasqevse
qqkaeydkra	eerkarfldn	qkikktpvvs	leydfekqr	idnendkklv
vsaptkkpts	pttytetttq	vpmpverqt	qqqiynapk	qlaglngesh
dfttthqspt	tsnhthnnvv	efeetsalpg	rksgslvgis	qidsshlt
ekrvikrehv	reaqklvdny	kdthsykdri	naqqkvntls	eghqkrfnkq
inkvyngk (SEQ ID NO: 75)				

Secuencias adicionales de vWbp:

USA300

GTGTTTTCTGGGGAGAAGAATCCATATGTATCTGAGTCGTTGAACTGACTAATAATAAAAAATAATCT
 AGAACAGTAGAAGAGTATAAGAAAAGCTTGGATGATTTAATATGGTCCTTTCCAAACTTAGATAATGAAAGATTT
 GATAATCCTGAATATAAAGAAGCTATGAAAAAATATCAACAGAGATTTATGGCTGAAGATGAGGCCTTTGAAGAAA
 TTTTTTAGTGAAGAGAAAAAAATAAAAAATGGAATACTGATAATTTAGATTATCTAGGATTATCTCATGAAAGA
 TATGAAAGTGTATTTAATACTTTGAAAAAACAAAGTGAGGAGTTCCTTAAAAGAAATTGAAGATATAAAAAAGAT
 AACCTGAATTGAAAGACTTTAATGAAGAGGAGCAATTAAAGTGCGACTTAGAATTAAACAAATTAGAAAATCAG
 ATATTAATGTTAGGTAAAACATTTTATCAAACTATAGAGATGATGTTGAAAGTTTATATAGTAAGTTAGATTTA
 ATTATGGGATATAAAGATGAAGAAAAGAGCAAATAAAAAAGCAGTTAACAAAAGGATGTTAGAAAATAAAAAAGAA
 GACTTAGAAAACCATAATTGATGAATTTTTTAGTGATATAGATAAAACAAGACCTAATAATATTCCTGTTTTAGAA
 GATGAAAAACAAGAAGAGAAAAATCATAAAAAATATGGCTCAATTAAAATCTGACACTGAAGCAGCAAAAAGTGAT
 GAATCAAAAAGAAGCAAGAGAAAGTAAAAAGAAGTTTAAATACTCAAAATCACAAACCTGCATCTCAAGAAGTTTCT
 GAACAACAAAAAGCTGAATATGATAAAAGAGCAGAAGAAAAGAAAGCGAGATTTTTGGATAATCAAAAAATTAAG
 AAAACACCTGTAGTGTCATTAGAATATGATTTTGAGCATAAACACGTATTGACAACGAAAACGACAAGAACTT
 GTGGTTTTCTGCACCAACAAAGAAACCAACATCACCGACTACATATACTGAAACAACGACACAGGTACCAATGCCT
 ACAGTTGAGCGTCAAACTCAGCAACAAATTATTTATAATGCACCAAAACAATTGGCTGGATTAAATGGTGAAAGT
 CATGATTTCAACAACGCATCAATCACCAACAACTTCAAATCACACGCATAATAATGTTGTTGAATTTGAAGAA
 ACGTCTGCTTTACCTGGTAGAAAATCAGGATCACTGGTTGGTATAAGTCAAATTGATTCTTCTCATCTAACTGAA
 CGTGAGAAGCGTGTAATTAAGCGTGAACACGTTAGAGAAGCTCAAAAGTTAGTTGATAATTATAAAGATACACAT
 AGTTATAAAGACCGAATAAATGCACAACAAAAAGTAAATACTTTAAGTGAAGGTCATCAAAAACGTTTTTAATAAA
 CAAATCAATAAAGTATATAATGGCAAATAA (SEQ ID NO: 76)

N315

GTGGTTTTCTGGGGAGAAGAATCCATATGTATCAAAAGCTTTAGAATTGAAAGATAAAAGTAATAAATCC
 AATTCTTACGAAAATTATAGAGATAGTTTAGAAAGTTTGATTTTCATCATTATCTTTTGCTGATTATGAAAAATAT
 GAAGAGCCAGAATATGAAAAGGCTGTAAAAAATATCAACAAAAATTTATGGCTGAAGATGATGCATTAAAAAAT
 TTTTTAAATGAAGAAAAGAAGATAAAAAATGCAGATATTAGCAGAAAATCGAATAATTTATTAGGTTTAACACAT
 GAAAGATATTCTTATATTTTTGATACATTAAAGAAAAATAACAAGAGTTTTTAAAAGATATTGAAGAAATACAA
 CTGAAAAATAGTGATTTAAAGGACTTTAACAATACAGAGCAACATAATGCCGACGTAGAAATAAACAATTTAGAA
 AATAAAGTATTAATGGTAGGGTATACATTCTATAATACAAATAAGGACGAAGTTGAAGAATTATATAGTGAGTTA
 GATTTGATTGTTGGAGAAGTTCAAGATAAGTCGGATAAAAAAAGAGCAGTAAATCAAAGGATGTTAAATAGAAAA
 AAAGAGGATTTAGAATTTATTATAGATAAATTTTTTAAAAAATTCACAAGAACGTCCAGAGAGTATACCAGCA
 TTAAGTAGTAAAAAAATCATAATCAGACTATGGCATTAAAGTTAAAAGCAGATACAGAAGCTGCTAAAAATGAC
 GTATCAAAAAGAAGTAAAAGAAGTTTAAATACTCAAAATAATAAATCTACAACACAAGAAATTTCTGAAGAACAA
 AAAGCTGAATATCAAAGAAAGTCAGAGGCATTTAAAAGAAAGATTTATAAACAGACAAAAATCTAAAAATGAGTCT

GTGGTTTCTACTAATCGATGACGAAGACGACAACGAAAACGACAGGCAACTTGTGGTTTCTGCGCCATCAAAGAAA
 CCAACAACACCGACTACATATACTGAAACAACGACTCAGGTACCAATGCCACAGTTGAGCGTCAAACCTCAGCAA
 CAAATCGTTTACAAAACACCAAAACCATTAGCTGGATTAAATGGTGAAAGTCATGATTTTACAACAACGCATCAA
 TCACCAACAACCTTCAAATCATACGCATAATAATGTTGTTGAATTTGAAGAAACGTCTGCTTTACCTGGTAGAAAA
 TCAGGATCACTGGTTGGTATAAGTCAAATTGATTCTTCTCATCTAACTGAACGTGAGAAGCGTGTAAATCAAGCGT
 GAACACGTTAGAGAAGCTCAAAAAGTTAGTTGATAATTATAAAGATACACATAGTTATAAAGACCGATTAAATGCA
 CAACAAAAAGTAAATACTTTAAGTGAAAGTCATCAAAAACGTTTTAATAAACAAATCAATAAAGTATACAATGGC
 AAATAA (SEQ ID NO: 77)

MRSA252

GTGGTTTCTGGGGAGGAGAATCCATATAAATCTGAGTCATTGAAATTAAATGGGAAAAGAAGTACTACA
 ATAAGTAGTGATAAATATGAAGAAAATTTAGATATGTTAATATCGTCATTATCATTTGCAGATTATGAAAAATAT
 GAGGAACCAGAATACAAAGAAGCAGTTAAAAAGTATCAACAAAAATTTATGGCTGAAGATGATGCATTAAAAAT
 TTTTGTAGTGAAGAGAAAAAATAAAAAATAGAAATACATAACATCAAATTATCTGGGATTAACACACGAAAGAT
 ATGAGTCAATTTATAATTCATTAAAAATCATCGTGAAGAATTTTCAAAGAAATCGAAGAAATTAATAATAAAA
 ATCCAGTGTTAAAAGAATATAACAATGAGGAACAACTAAAGCTGATACGGAATTAAACACTCTTGAAAATCAAG
 TACTAATGATAGGTTATACATTTTATCACTCGAATAAAAAATGAAGTAGAAGATTTATATAACAAATTAGATATGA
 TTCTTGGTTATAAAGATGAAGAGAGAAAAAGAAGAGGGCTACCAATCAAAGAATGTTCAATAATAAAAAAGAGG
 ATTTAGAAACTATTATTGATGAATTCTTTGGAGAAATTGGACAACAAAGGCCAACATCTATACCAACATTAGCGC
 CTAAAGAAGAAAAAGAAACAAATATAAAAAATGCAATAAATTAAATCTGACACTGAAGCAGCAAAAAATGATG
 AAGCAAAAAGAAGTTTAAATACCCACAATCACAAATCTGTATCTCAAGAAGTCTCTGAACAACAAAAAGCTGACT
 ACGAAAGAAAAGCTGAAGAAAAGAAAGCGAGATTTTGTAGATAAGCAAAAAATAAGAAAACCTCTGTAGTTTCAT
 TAGAATATGATTTTGAACATAAAACAACGTGTTGACAACGAAACGACAAGCAACTTGTGGTTTCTGAGCCATCAA
 AGAAACCAACAACACCGCTACATACACTGAAACAACCACACAGCTACCAATGCCTACAGTTGAGCGTCAAACAC
 AGCAACAAATCGTTTACAAAGCACCAAAACCATTAGCTGGATTAAATGGTGAAAGTCATGATTTTACAACAACGC
 ATCAATCACCAACTACTTCAAATCACACGCATAATCATCTTATTGAAATTGAAGAAACATCTGCTTTACCTGGTA
 GAAAGACAGGTTTATTGGTTGGTTTGTAGTCAAATTGATTCTTCGCATTTAACTGAACGTGAGAAGCGCGTGATTA
 AACGTGAACACGTGAGAGAAGCTCAAAAGTTAGTTGATAATTATAAAGATACACATAGTTATAAAGACCGATTAA
 ATGCCCAACAAAAAGTAAATACTTTAAGTGCAGGTCATCAAAAACGTTTTAATAAACAAATTAATAAAGTATATA
 ATGGCAAATAATTAATGCATGGCTGCAAAGGAAATAATGAGTTTGCCGTAAAAATAACAACATTTTAACTAGCA
 ATAAATAATATCAAAGTCATCATTTCAATGATGCAATCTAGTATAGTCCACATTCTAAACAGGTGTGGACTATTA
 CTTTTTCTACTTTATATTACGAAAAAATTATTATGCTTAACTATCAATATCAATAATTAATTTTAAGCTGAAAA
 CAATAAAAAATGTTAAGACAACGTTTACTTCAAGTTAATTATTATACTGAAAATTCTGGTATATAATGCTGTTAGT
 GAATATAACAGGAAAAATTAAATTGGTTATGATATTGAGTCTATATAAAGGAGAAATAACAGATGAAAAAGAAATT
 ATTAGTTTTAACTATGAGCACGCTATTTGCTACACAATTTATGAATTCAAATCACGCTAATGCATCAACAGAAAG
 TGTTGATAAAAACTTTGTAGTTCAGAAATCGGGTATTAATAAAATTATTCCAATTACGATGAATTTAAAAAAGC
 ACCAAAAGTAAATGTTAGTAATTTAGCTGACAACAAAACTTTGTAGCTTCTGAAGATAAATTGAATAAGATTGC
 AGATCCATCGGCAGCTAGTAAATTTGTAGATAAAAACTTTGCCGTACCAGAATCAAATTAGGAATCATTGTACC
 AGAGTATAAAGAAATCAATAATCGAGTGAATGTAACAACAAACAATCCAGCTTCAAACAAGTTGACAAGCAAAT
 TGTTGCTAAAGACCCAGAGGTGAATAGATTTATTACGCAAAATAAAGTAAACCATCGTTTCATTACTACGCAAC

CCACTATAAGAAAGTTATTACTTCATACAAATCAACACATGTACATAAACATGTAAACCATGCAACATCTTCTAT
CCATCATCACTTTACTATTAAACCATCAGAAGCACCTAGATATACACACCCATCTCAATCTCAATCGTTAATTAT
AAATCATCATTTTGCAGTTCCTGGATACCATGGTCATAAAGTTGTAACACCAGGACAAGCTAGTATTAGAATTCA
TCACTTTTGTGCTGTACCTCAAATAAATAGTTTTAAGGTCATTCCATCATATGGTCACAATTCACATCGTATGCA
TGTACCAAGTTTCCAAAATAACACAACAGCAACACATCAAAATGCAAAAGTAAATAAACTTATAACTATAAATA
TTTTTATACTTATAAAGTAGTCAAAGGTGTAAAAAACATTTCTCATTTTCAAATCACATGGTTGTAAAATTGT
TAAACCAGCATTAACATCAAAAATGTAAATTATCAATATGCTGTTCCAAGTAATAGCCCTACACACGTTGTTCC
TGAGTTTCAGGGTATCTTACCAGCACCACGAGTATAAAAATTGACATTAAGTTTACGAGATATGATAAATACCTA
TTATTTTAAACATAGTCTGCAATCTATGAGGTTGTAGGCTATGTTTTTGCAGTTTATCAATAAACACCCATCAA
CAAATTATACCGTTTTTCTACTTTAAAAGTTGGAAGTAACATAATCTTAAATAAATATATTATTAATTAAGATAA
ATATAAGACTCGAGATTATTGTTAATAGTTTGTTCATCGCAAGTTAATTATTGTTTCTAAAATATTGGTATATAA
TTTTCAATGGCGAAGAAAACAGGGTAAAAAGTCGGTTTTTAAATCAAAGCAAATAAGGAGTAAAAAATGAAAAG
GAAAGTACTAGTATTAACAATGGGCGTACTTTGTGCGACACAATTATGGCAAACGAATAATGCAAAAGCTTTAGT
GACAGAGAGTGGCGTTAATGATACTAAGCAATTTACTGAAGTAACATCGGAAGAAAAGTTATAAAAGATGCTAT
TTGAAAGTCAATGAAAGCTTTATTTACTATCCCCAAAATGATTTGAAGGGATTAGGTGGAGAACACAACGATTA
CGAAAAAATTACATATAGCACTTCTTCTAATAATGTTTTAGAATTATCAATGAGTTCAAATACGTAGGCGGTAA
ATCAGGAGCTATGGTTGGTTATAGTGAAATTTACTCATCACATTTACAGACCGCGACAAACGTGCTATCAGACG
TGATCATGTTAAAGAAGCACAAAACCTGATTAATGATTATAAATATACGCAAATATATGAAGACTTTGCTAAAGC
TACTGCAAAGGTAAGTACACTTAGTCACTCACCAAAATTATTTAAATAAACAAATTGATAAAGTGAATAATAA
GATAGAGAAAACGCTAA (SEQ ID NO: 78)

MW2

5

D1D2-

GTGGTTTCTGGGGAGAAGAATCCATATGTATCTGAGTCGTTGAACTGACTAATAATAAAAAATAAATCTAGAACA
GTAGAAGAGTATAAGAAAAGCTTGATGATTTAATATGGTCCTTTCCAACTTAGATAATGAAAGATTTGATAAT
CCTGAATATAAAGAAGCTATGAAAAAATATCAACAGAGATTTATGGCTGAAGATGAGGCTTTGAAGAAATTTTTT
AGTGAAGAGAAAAAATAAAAAATGGAAATACTGATAATTTAGATTATCTAGGATTATCTCATGAAAGATATGAA
AGTGTATTTAATACTTTGAAAAACAAAGTGAGGAGTCTTAAAAGAAATTGAAGATATAAAAAAGATAACCCCT
GAATTGAAAGACTTTAATGAATAG (SEQ ID NO: 79)

10

>USA300_yWbp

VVSGEKNPYVSESLKLTNNKNKSRTVEEYKKSLLDLIWSFPNLDNERFDNPEYKEAMKKYQQRFMAEDE
ALKKFFSEEKIKNGNTDNLGYLGLSHERYESVFNTLKKQSEEFKEIEDIKKDNPELKDFNEEEQLKCDLELNK
LENQILMLGKTFYQNYRDDVESLYSKLDLIMGYKDEERANKKAVNKRMLNKKEDLETIIDEFFSDIDKTRPNNI
PVLEDEKQEEKNHKNMAQLKSDTEAAKSDESKRSKRSKSLNTQNHKPASQEVSEQQKAEYDKRAEERKARFLDN
QKIKKTPVVSLEYDFEHKQRIDNEND (SEQ ID NO: 80)

KKLVVSAPTKKPTSPTTYTETTTQVPMPTVERQTQQQIIYNAPKQLAGLNGESHDFTTTHQSPTTSNHT
HNNVVEFEETSALPGRKSGSLVGISQIDSSHLTEREKRVIKREHVREAQKLVDNYKDTHSYKDRINAQQKVNTLS
EGHQKRFNKQINKVYNGK (SEQ ID NO: 81)

>N315_vWbp

VVSGEKNPYVSKALELKDKSNKSNSYENYRDSLESLSLFSADYEEKYEEPEYKAVKKYQQKFMAEDD
ALKNFLNEEKKIKNADISRKSNNLLGLTHERYSYIFDTLKKNKQEFKLDIEEIQLKNSDLKDFNNTEQHNADVEI
NNLENKVLVMGYTFYNTNKDEVEELYSELDLIVGEVQDKSDKKRAVNQRMNLRKKEDLEFIIDKFFKKIQQERPE
SIPALTSEKNHNQTMALKLKADTEAAKNDVSKRSKRSNTQNNKSTTQEISEEQKAEYQRKSEALKERFINRQKS
KNESVVSLLIDEDDNENDRQLVVSAP (SEQ ID NO: 82)

SKKPTTPTTYTETTTQVPMPTVERQTQQQIVYKTPKPLAGLNGESHDFTTTHQSPTTSNHTHNNVVEFE
ETSALPGRKSGSLVGISQIDSSHLTEREKRVIKREHVREAQKLVDNYKDTHSYKDRINAQQKVNTLSEGHQKRFN
KQINKVYNGK (SEQ ID NO: 83)

>MRSA252_vWbp

VVSGEENPYKSESLKLNKGRSTTITSKYEENLDMLISSLSFADYEEKYEEPEYKEAVKKYQQKFMAEDD
ALKNFLVKRKK (SEQ ID NO: 84)

>MW2_vWbp

VVSGEKNPYVSESLKLTNNKNKSRTVEEYKKSLLDLIWSFPNLDNERFDNPEYKEAMKKYQQRMAEDE
ALKKFFSEEKKIKNGNTDNLGYLSHERYESVFNTLKKQSEEFLEIEDIKKDNPELKDFNE (SEQ ID
NO: 85)

>Newman_vWbp

VVSGEKNPYVSESLKLTNNKNKSRTVEEYKKSLLDLIWSFPNLDNERFDNPEYKEAMKKYQQRMAEDE
ALKKFFSEEKKIKNGNTDNLGYLSHERYESVFNTLKKQSEEFLEIEDIKKDNPELKDFNEEQKCDLELNK
LENQILMLGKTFYQNYRDDVESLYSKLDLIMGYKDEERANKKAVNKRMLNKKEDLETIIDEFFSDIDKTRPNNI
PVLEDEKQEEKNHKNMAQLKSDTEAAKSDESKRSKRSKRSNTQNHKPASQEVSEQQKAEYDKRAEERKARFLDN
QKIKKTPVVSLEYDFEHKQRIDNEND (SEQ ID NO: 86)

KKLVVSAPTKKPTSPTTYTETTTQVPMPTVERQTQQQIIYNAPKQLAGLNGESHDFTTTHQSPTTSNHTHNNVVE
FEETSALPGRKSGSLVGISQIDSSHLTEREKRVIKREHVREAQKLVDNYKDTHSYKDRINAQQKVNTLSEGHQKR
FNKQINKVYNGK (SEQ ID NO: 87)

REFERENCIAS

Patente de los Estados Unidos 3.791.932
Patente de los Estados Unidos 3.949.064
Patente de los Estados Unidos 4.174.384
Patente de los Estados Unidos 4.338.298
Patente de los Estados Unidos 4.356.170
Patente de los Estados Unidos 4.367.110
Patente de los Estados Unidos 4.372.945
Patente de los Estados Unidos 4.452.901
Patente de los Estados Unidos 4.474.757
Patente de los Estados Unidos 4.554.101

	Patente de los Estados Unidos 4.578.770
	Patente de los Estados Unidos 4.596.792
	Patente de los Estados Unidos 4.599.230
	Patente de los Estados Unidos 4.599.231
5	Patente de los Estados Unidos 4.601.903
	Patente de los Estados Unidos 4.608.251
	Patente de los Estados Unidos 4.683.195
	Patente de los Estados Unidos 4.683.202
	Patente de los Estados Unidos 4.684.611
10	Patente de los Estados Unidos 4.690.915
	Patente de los Estados Unidos 4.690.915
	Patente de los Estados Unidos 4.748.018
	Patente de los Estados Unidos 4.800.159
	Patente de los Estados Unidos 4.879.236
15	Patente de los Estados Unidos 4.952.500
	Patente de los Estados Unidos 5.084.269
	Patente de los Estados Unidos 5.199.942
	Patente de los Estados Unidos 5.221.605
	Patente de los Estados Unidos 5.238.808
20	Patente de los Estados Unidos 5.302.523
	Patente de los Estados Unidos 5.310.687
	Patente de los Estados Unidos 5.322.783
	Patente de los Estados Unidos 5.384.253
	Patente de los Estados Unidos 5.464.765
25	Patente de los Estados Unidos 5.512.282
	Patente de los Estados Unidos 5.512.282
	Patente de los Estados Unidos 5.538.877
	Patente de los Estados Unidos 5.538.880
	Patente de los Estados Unidos 5.548.066
30	Patente de los Estados Unidos 5.550.318
	Patente de los Estados Unidos 5.563.055
	Patente de los Estados Unidos 5.580.859
	Patente de los Estados Unidos 5.589.466
	Patente de los Estados Unidos 5.591.616
35	Patente de los Estados Unidos 5.610.042
	Patente de los Estados Unidos 5.620.896
	Patente de los Estados Unidos 5.648.240
	Patente de los Estados Unidos 5.656.610
	Patente de los Estados Unidos 5.702.932
40	Patente de los Estados Unidos 5.736.524
	Patente de los Estados Unidos 5.780.448
	Patente de los Estados Unidos 5.789.215
	Patente de los Estados Unidos 5.801.234
	Patente de los Estados Unidos 5.840.846
45	Patente de los Estados Unidos 5.843.650
	Patente de los Estados Unidos 5.846.709
	Patente de los Estados Unidos 5.846.783
	Patente de los Estados Unidos 5.849.497
	Patente de los Estados Unidos 5.849.546
50	Patente de los Estados Unidos 5.849.547
	Patente de los Estados Unidos 5.858.652
	Patente de los Estados Unidos 5.866.366
	Patente de los Estados Unidos 5.871.986
	Patente de los Estados Unidos 5.916.776
55	Patente de los Estados Unidos 5.922.574
	Patente de los Estados Unidos 5.925.565
	Patente de los Estados Unidos 5.925.565
	Patente de los Estados Unidos 5.928.905
	Patente de los Estados Unidos 5.928.906
60	Patente de los Estados Unidos 5.932.451
	Patente de los Estados Unidos 5.935.819
	Patente de los Estados Unidos 5.935.825
	Patente de los Estados Unidos 5.939.291
	Patente de los Estados Unidos 5.942.391
65	Patente de los Estados Unidos 5.945.100
	Patente de los Estados Unidos 5.958.895

- Patente de los Estados Unidos 5.981.274
 Patente de los Estados Unidos 5.994.624
 Patente de los Estados Unidos 6.008.341
 Patente de los Estados Unidos 6.288.214
 5 Patente de los Estados Unidos 6.294.177
 Patente de los Estados Unidos 6.651.655
 Patente de los Estados Unidos 6.656.462
 Patente de los Estados Unidos 6.733.754
 Patente de los Estados Unidos 6.756.361
 10 Patente de los Estados Unidos 6.770.278
 Patente de los Estados Unidos 6.793.923
 Patente de los Estados Unidos 6.814.971
 Patente de los Estados Unidos 6.936.258
 Solicitud de patente de los Estados Unidos 2002/0169288
 15 Solicitud de patente de los Estados Unidos 2003/0153022
 Abdallah *et al.*, Mol. Microbiol., 62, 667-679, 2006.
 Abdallah *et al.*, Nat. Rev. Microbiol., 5, 883-891, 2007.
 Adams y Bird, Nephrology. 14: 462-470, 2009.
 Albus *et al.*, Infect Immun. 59: 1008-1014, 1991.
 20 An, J. Virol., 71 (3): 2292-302, 1997.
 Anavi, SC. tesis del departamento de microbiología molecular y biotecnología de la Universidad de Tel-Aviv, Israel, 1998.
 Andersen *et al.*, J. Immunol., 154, 3359-3372, 1995.
 Andersen *et al.*, Biol Chem. 390: 1279-1283, 2009.
 25 Angel *et al.*, Cell, 49: 729, 1987b.
 Angel *et al.*, Mol. Cell. Biol., 7: 2256, 1987a.
 Archer, Clin. Infect. Dis., 26, 1179-1181, 1998.
 Ariens *et al.*, Blood. 96: 988-995, 2000.
 Arrecubieta *et al.*, J Infect Dis. 198: 571-575, 2008.
 30 Atchison y Perry, Cell, 46: 253, 1986.
 Atchison y Perry, Cell, 48: 121, 1987.
 Ausubel *et al.*, en: Current Protocols in Molecular Biology, John, Wiley & Sons, Inc, Nueva York, 1996.
 Baba *et al.*, J. Bacteriol. 190: 300-310, 2007.
 Baba *et al.*, Lancet. 359: 1819-1827, 2002.
 35 Baddour *et al.*, J Infect Dis. 165: 749-753, 1992.
 Baddour *et al.*, J Med Microbiol. 41: 259-263, 1994.
 Bae y Schneewind, Plasmid, 55: 58-63, 2006.
 Bae *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101, 12312-12317, 2004.
 Balaban *et al.*, Science. 280: 438-440, 1998.
 40 Banerji *et al.*, Cell, 27 (2 parte 1): 299-308, 1981.
 Banerji *et al.*, Cell, 33 (3): 729-740, 1983.
 Barany y Merrifield, en: The Peptides, Gross y Meienhofer (Eds.), Academic Press, NY, 1-284, 1979.
 Behring. Deutsche Medizinische Wochenschrift. 16: 1145-8, 1890.
 Bellus, J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem., A31 (1): 1355-1376, 1994.
 45 Berger, J Pathol Bacteriol. 55, 1943.
 Berkhout *et al.*, Cell, 59: 273-282, 1989.
 Birch-Hirschfeld, Klinische Wochenschrift. 13: 331, 1934.
 Bjerketorp *et al.*, FEMS Microbiol Lett. 234: 309-314, 2004.
 Bjerketorp *et al.*, Microbiol. 148: 2037-2044, 2002.
 50 Blonar *et al.*, EMBO J., 8: 1139, 1989.
 Blomback *et al.*, Nature. 275: 501-505, 1978.
 Boake, J Immunol. 76: 89-96, 1956.
 Bodine y Ley, EMBO J., 6: 2997, 1987.
 Borrebaeck, en: Antibody Engineering--A Practical Guide, W. H. Freeman and Co., 1992.
 55 Boshart *et al.*, Cell, 41: 521, 1985.
 Bosze *et al.*, EMBO J., 5 (7): 1615-1623, 1986.
 Boucher y Corey. Clin. Infect. Dis. 46: S334-S349, 2008.
 Braddock *et al.*, Cell, 58: 269, 1989.
 Brown *et al.*, Biochemistry, 37: 4397-4406, 1998.
 60 Bubeck Wardenburg y Schneewind. J. Exp. Med. 205: 287-294, 2008.
 Bubeck-Wardenburg *et al.*, Infect. Immun. 74: 1040-1044, 2007.
 Bubeck-Wardenburg *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103: 13831-13836, 2006.
 Bulla y Siddiqui, J. Virol., 62: 1437, 1986.
 Burke *et al.*, J. Inf. Dis., 170: 1110-1119, 1994.
 65 Burlak *et al.*, Cell Microbiol., 9: 1172-1190, 2007.
 Burts y Missiakas, Mol. Microbiol., 69: 736-46, 2008.

- Burts *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102: 1169-1174, 2005.
 Cadness-Graves *et al.*, Lancet. 2: 736-738, 1943.
 Camargo y Gilmore, J Bacteriol. 190: 2253-2256, 2008.
 Campbell y Villarreal, Mol. Cell. Biol., 8: 1993, 1988.
 5 Campere y Tilghman, Genes and Dev., 3: 537, 1989.
 Campo *et al.*, Nature, 303: 77, 1983.
 Carbonelli *et al.*, FEMS Microbiol. Lett., 177 (1): 75-82, 1999.
 Cawdery *et al.*, British J Exp Pathol. 50: 408-412, 1969.
 Cedergren *et al.*, Protein Eng., 6: 441-448, 1993.
 10 Celander y Haseltine, J. Virology, 61: 269, 1987.
 Celander *et al.*, J. Virology, 62: 1314, 1988.
 Cespedes *et al.*, J. Infect. Dis. 191 (3): 444-52, 2005.
 Chambers y Deleo. Nature Rev Microbiol. 7: 629-641, 2009.
 Champion *et al.*, Science, 313: 1632-1636, 2006.
 15 Chandler *et al.*, Cell, 33: 489, 1983.
 Chandler *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94 (8): 3596-601, 1997.
 Chang *et al.*, Lancet., 362 (9381): 362-369, 2003.
 Chang *et al.*, Mol. Cell. Biol., 9: 2153, 1989.
 Chapman *et al.*, J Bacteriol. 28: 343-363, 1934.
 20 Chatterjee *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 9114, 1989.
 Chen y Okayama, Mol. Cell Biol., 7 (8): 2745-2752, 1987.
 Cheng *et al.*, Trends Microbiol. 19: 225-232, 2011.
 Cheng *et al.*, FASEB J., 23: 1-12, 2009.
 Cheng *et al.*, FASEB J. 23 (10): 3393-3404, 2009.
 25 Cheng *et al.*, PLoS Pathogens. 6, 2010.
 Cheung *et al.*, Infect Immun. 63: 1914-1920, 1995.
 Choi *et al.*, Cell, 53: 519, 1988.
 Chu *et al.*, Am J Med. 118: 1416, 2005.
 Clarke *et al.*, Ad Microbial Phys. 51: 187-224, 2006.
 30 Cocea, Biotechniques, 23 (5): 814-816, 1997.
 Cohen *et al.*, J. Cell. Physiol., 5: 75, 1987.
 Cosgrove *et al.*, Infect. Control Hosp. Epidemiol. 26: 166-174, 2005.
 Costa *et al.*, Mol. Cell. Biol., 8: 81, 1988.
 Crawley *et al.*, J Thrombosis Haemostasis. 5 Supl. 1: 95-101, 2007.
 35 Cripe *et al.*, EMBO J., 6: 3745, 1987.
 Culotta y Hamer, Mol. Cell. Biol., 9: 1376, 1989.
 Dalbey y Wickner, J. Biol. Chem., 260: 15925-15931, 1985.
 Dandolo *et al.*, J. Virology, 47: 55-64, 1983.
 de Haas *et al.*, J Exp Med. 199: 687-695, 2004.
 40 De Villiers *et al.*, Nature, 312 (5991): 242-246, 1984.
 DeBord *et al.*, Infect. Immun., 74: 4910-4914, 2006.
 DeDent, *et al.*, Sem Immunopathol. 34: 317-333, 2012.
 DeDent *et al.*, EMBO J. 27: 2656-2668, 2008.
 DeDent *et al.*, J. Bacteriol. 189: 4473-4484, 2007.
 45 Deisenhofer *et al.*, Hoppe-Seyh Zeitsch. Physiol. Chem. 359: 975-985, 1978.
 Deisenhofer, Biochemistry 20: 2361-2370, 1981.
 Deivanayagam *et al.*, EMBO J. 21: 6660-6672, 2002.
 DeLeo *et al.*, Lancet. 375: 1557-1568, 2010.
 Delvaeye y Conway, Blood. 114: 2367-2374, 2009.
 50 Deschamps *et al.*, Science, 230: 1174-1177, 1985.
 Devereux *et al.*, Nucl. Acid Res., 12: 387-395, 1984.
 Diep *et al.*, J. Infect. Dis., 193: 1495-1503, 2006a.
 Diep *et al.*, Lancet., 367: 731-739, 2006b.
 Dinges *et al.*, Clin. Microbiol. Rev., 13: 16-34, 2000.
 55 Donahue *et al.*, PNAS USA. 91: 12178-12182, 1994.
 Doolittle, Blood Rev. 17: 33-41, 2003.
 Duthie y Lorenz, J. Gen. Microbiol., 6: 95-107, 1952.
 Duthie, J Gen Microbiol. 6: 95-107, 1952.
 Duthie, J Gen Microbiol. 10: 427-436, 1954.
 60 Edbrooke *et al.*, Mol. Cell. Biol., 9: 1908, 1989.
 Edlund *et al.*, Science, 230: 912-916, 1985.
 Ekstedt y Yotis, J Bacteriol. 80: 496-500, 1960.
 Ekstedt y Yotis, Ann. N. Y. Acad. Sci., 80: 496-500, 1960.
 Emorl y Gaynes, Clin. Microbiol. Rev., 6: 428-442, 1993.
 65 Enright *et al.*, J Clin Microbiol. 38: 1008-1015, 2000.
 Documento EP 0786519 Documento EP 497524 Documento EP 497525

- Epitope Mapping Protocols en: Methods in Molecular Biology, vol. 66, Morris (Ed.), 1996.
 Etz *et al.*, PNAS USA. 99: 6573-6578, 2002.
 Fattom *et al.*, Vaccine. 23: 656-663, 2004.
 5 Fechheimer *et al.*, Proc Natl. Acad. Sci. USA, 84: 8463-8467, 1987.
 Feng y Holland, Nature, 334: 6178, 1988.
 Ferry *et al.*, Curr Infect Dis Report. 7: 420-428, 2005.
 Field y Smith, J. Comp. Pathol., 55: 63, 1945.
 Firak y Subramanian, Mol. Cell. Biol., 6: 3667, 1986.
 Fitzgerald *et al.*, Nature Rev Microbiol. 4: 445-457, 2006.
 10 Foecking y Hofstetter, Gene, 45 (1): 101-105, 1986.
 Fortune *et al.*, Proc Natl. Acad. Sci. USA, 102: 10676-10681, 2005.
 Foster, Nat. Rev. Microbiol., 3: 948-958, 2005.
 Fournier *et al.*, Infect. Immun., 45: 87-93, 1984.
 Fowler *et al.*, New England J Med. 355: 653-665, 2006.
 15 Fowler *et al.*, JAMA. 293: 3012-3021, 2005.
 Fraley *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 3348-3352, 1979.
 Friedrich *et al.*, Nature. 425: 535-539, 2003.
 Fujita *et al.*, Cell, 49: 357, 1987.
 Gailani y Renne, Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biol. 27: 2507-2513, 2007.
 20 Ganesh *et al.*, PLoS Pathogens. 4: e1000226, 2008.
 Solicitud del Reino Unido 2 202 328
 Geoghegan *et al.*, J Biol Chem. 285: 6208-6216, 2010.
 Gilles *et al.*, Cell, 33: 717, 1983.
 Gloss *et al.*, EMBO J., 6: 3735, 1987.
 25 Godbout *et al.*, Mol. Cell. Biol., 8: 1169, 1988.
 Gómez *et al.*, EMBO J. 26: 701-709, 2007.
 Gómez *et al.*, J. Biol. Chem. 281: 20190-20196, 2006.
 Gómez *et al.*, Nature Med. 10: 842-8, 2004.
 Gong *et al.*, Clin Vacc Immunol. CVI 17: 1746-1752, 2010.
 30 González *et al.*, CMLS. 65: 493-507, 2008.
 Goodbourn y Maniatis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 1447, 1988.
 Goodbourn *et al.*, Cell, 45: 601, 1986.
 Goodyear y Silverman, J. Exp. Med., 197: 1125-1139, 2003.
 Goodyear *et al.*, PNAS USA. 101: 11392-11397, 2004.
 35 Gopal, Mol. Cell Biol., 5: 1188-1190, 1985.
 Gouda *et al.*, Biochemistry, 31 (40): 9665-72, 1992.
 Gouda *et al.*, Biochemistry, 37: 129-36, 1998.
 Graham y Van Der Eb, Virology, 52: 456-467, 1973.
 Graille *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 97: 5399-5404, 2000.
 40 Gravenkemper *et al.*, J Bacteriol. 89: 1005-1010, 1965.
 Greene *et al.*, Immunology Today, 10: 272, 1989
 Grosschedl y Baltimore, Cell, 41: 885, 1985.
 Guinn *et al.*, Mol. Microbiol., 51: 359-370, 2004.
 Guss *et al.*, Eur. J. Biochem. 138: 413-420, 1984.
 45 Hair *et al.*, Infect Immun. 78: 1717-1727, 2010.
 Hale y Smith, Br J Exp Pathol. 26: 209-216, 1945.
 Hall *et al.*, Infect Immun. 71: 6864-6870, 2003.
 Haraldsson y Jonsson, J Comp Pathol. 94: 183-196, 1984.
 Harland y Weintraub, J. Cell Biol., 101 (3): 1094-1099, 1985.
 50 Harlow *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.,
 capítulo 8, 1988.
 Harrison, Br Med J. 2: 149-152, 1963.
 Harrison, J Pathol Bacteriol. 87: 145-150, 1964.
 Harro *et al.*, Clin Vacc Immun. CVI 17: 1868-1874, 2010.
 55 Hartleib *et al.*, Blood. 96: 2149-2156, 2000.
 Harvey *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 1084-1088, 1986.
 Haslinger y Karin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 8572, 1985.
 Hauber y Cullen, J. Virology, 62: 673, 1988.
 Haul *et al.*, J Med Chem. 45: 1757-1766, 2002.
 60 Hawiger *et al.*, Nature. 258: 643-645, 1975.
 Hawiger *et al.*, Biochem. 21: 1407-1413, 1982.
 Heilmann *et al.*, J Infect Dis. 186: 32-39, 2002.
 Hen *et al.*, Nature, 321: 249, 1986.
 Hendrix *et al.*, J Biol Chem. 258: 3637-3644, 1983.
 65 Hensel *et al.*, Lymphokine Res., 8: 347, 1989.
 Herold *et al.*, JAMA. 279: 593-598, 1998.

- Herr y Clarke, *Cell*, 45: 461, 1986.
- Hijikata-Okunomiya, *J Thrombosis Haemostasis*. 1: 2060-2061, 2003.
- Hirochika *et al.*, *J. Virol.*, 61: 2599, 1987.
- Hirsch *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10: 1959, 1990.
- 5 Holbrook *et al.*, *Virology*, 157: 211, 1987.
- Horlick y Benfield, *Mol. Cell. Biol.*, 9: 2396, 1989.
- Hsu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 12420-12425, 2003.
- Huang *et al.*, *Cell*, 27: 245, 1981.
- Huber-Lang *et al.*, *Nature Med.* 12: 682-687, 2006.
- 10 Hug *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8: 3065, 1988.
- Hussain *et al.*, *J Bacteriol.* 183: 6778-6786, 2001.
- Huston *et al.*, en: *Methods in Enzymology*, Langone (Ed.), Academic Press, NY, 203: 46-88, 1991.
- Hwang *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10: 585, 1990.
- Imagawa *et al.*, *Cell*, 51: 251, 1987.
- 15 Imbra y Karin, *Nature*, 323: 555, 1986.
- Imler *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7: 2558, 1987.
- Imperiale y Nevins, *Mol. Cell. Biol.*, 4: 875, 1984.
- Innis *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 85 (24): 9436-9440, 1988.
- Inoshima *et al.*, *Nat Med.* 17 (10): 1310-4, 2011.
- 20 Inouye e Inouye, *Nucleic Acids Res.*, 13: 3101-3109, 1985.
- Jakobovits *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8: 2555, 1988.
- Jameel y Siddiqui, *Mol. Cell. Biol.*, 6: 710, 1986.
- Jansson *et al.*, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 20: 69-78 1998.
- Jaynes *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8: 62, 1988.
- 25 Jensen, *Acta Path. Microbiol. Scand.* 44: 421-428, 1958.
- Jensen, *APMIS: acta pathol, microbiol et immunol Scandinavica*. 115: 533-539, 2007.
- Johnson *et al.*, *Methods in Enzymol.*, 203: 88-99, 1991.
- Johnson *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9: 3393, 1989.
- Johnstone y Smith, *Nature*. 178: 982-983, 1956.
- 30 Jones, *Carb. Research*, 340: 1097-1106, 2005.
- Jonsson *et al.*, *Oral Dis.*, 8 (3): 130-140, 2002.
- Jonsson *et al.*, *Infect Immun.* 49: 765-769, 1985.
- Josefsson *et al.*, *J Infect Dis.* 184: 1572-1580, 2001.
- Josefsson *et al.*, *PLoS One*. 3: e2206, 2008.
- 35 Joyce *et al.*, *Carbohydrate Research* 338: 903-922 (2003
- Kadesch y Berg, *Mol. Cell. Biol.*, 6: 2593, 1986.
- Kaeppeler *et al.*, *Plant Cell Rep.*, 8: 415-418, 1990.
- Kaida *et al.*, *J Biochem.* 102: 1177-1186, 1987.
- 40 Kallen *et al.*, *Ann Emerg Med.* 53: 358-365, 2009.
- Kaneda *et al.*, *Science*, 243: 375-378, 1989.
- Kanemitsu *et al.*, *Microbiol Immunol.* 45: 23-27, 2001.
- Kang *et al.*, *Am J Infection Control.* 40: 416-20, 2011.
- Kantyka *et al.*, *Adv Exp Med Biol.* 712: 1-14, 2011.
- Kapral, *J Bacteriol.* 92: 1188-1195, 1966.
- 45 Karesh. *Pediatric Focused Safety Review: Argatroban*. Pediatric Advisory Committee Meeting, 2009.
- Karin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7: 606, 1987.
- Katinka *et al.*, *Cell*, 20: 393, 1980.
- Kato *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266: 3361-3364, 1991.
- 50 Kawabata *et al.*, *J Biochem.* 97: 1073-1078, 1985.
- Kawabata *et al.*, *J Biochem.* 97: 325-331, 1985.
- Kawabata *et al.*, *J Biochem.* 98: 1603-1614, 1985.
- Kawamoto *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8: 267, 1988.
- Kennedy *et al.*, *J Infect Dis.* 202: 1050-1058, 2010.
- Kennedy *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 1327-1332, 2008.
- 55 Kernodle, *J Infect Dis.* 203: 1692-1693; respuesta del autor 1693-1694, 2011.
- Kiledjian *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8: 145, 1988.
- Kim *et al.*, *Vaccine*. 28: 6382-6392, 2001.
- Kim *et al.*, *FASEB J.* 25: 3605-3612, 2011.
- Kim *et al.*, *J Exp Med.* 207: 1863-1870, 2010.
- 60 Kinoshita *et al.*, *Microbiol Immunol.* 52: 334-348, 2008.
- Klamut *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10: 193, 1990.
- Klevens *et al.*, *Clin. Infect. Dis.*, 2008; 47: 927-30, 2008.
- Klevens *et al.*, *JAMA*, 298: 1763-1771, 2007.
- Kluytmans *et al.*, *Clin Microbiol Rev.* 10: 505-520, 1997.
- 65 Koch *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9: 303, 1989.
- Kohler y Milstein, *Nature* 256: 495-497 (1975

- Kolle y Otto. Z Hygiene. 41, 1902.
- Kollman *et al.*, Biochemistry. 48: 3877-3886, 2009.
- Konings *et al.*, Blood. 118 (14): 3942-51, 2011.
- Kopeck *et al.*, Thrombosis et diathesis haemorrhagica. 18: 475-486, 1967.
- 5 Koren *et al.*, J Clin Microbiol. 42: 792-799, 2004.
- Kruger *et al.*, PLoS One. 2: e623, 2007.
- Kriegler y Botchan, en: Eukaryotic Viral Vectors, Gluzman (Ed.), Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1982.
- Kriegler y Botchan, Mol. Cell. Biol., 3: 325, 1983.
- 10 Kriegler *et al.*, Cell, 38: 483, 1984a.
- Kriegler *et al.*, Cell, 53: 45, 1988.
- Kriegler *et al.*, en: Cancer Cells 2/Oncogenes and Viral Genes, Van de Woude *et al.* eds, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, 1984b.
- Kroh *et al.*, PNAS USA. 106: 7786-7791, 2009.
- 15 Kuehnert *et al.*, J Infect Dis. 193: 172-179, 2006.
- Kuhl *et al.*, Cell, 50: 1057, 1987.
- Kuklin *et al.*, Infect. Immun., 74: 2215-23, 2006.
- Kunz *et al.*, Nucl. Acids Res., 17: 1121, 1989.
- Kuroda *et al.*, Lancet., 357: 1225-1240, 2001.
- 20 Kwiecinski *et al.*, J Infect Dis. 202: 1041-1049, 2010.
- Kyte y Doolittle, J. Mol. Biol., 157 (1): 105-132, 1982.
- Lack, Nature. 161: 559, 1948.
- Lagergard *et al.*, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 11: 341-5, 1992.
- Lam *et al.*, J Bacteriol. 86: 611-615, 1963.
- 25 Lam *et al.*, J Bacteriol. 86: 87-91, 1963.
- Lancefield, J Immunol. 89: 307-313, 1962.
- Lancefield, J Exp Med. 47: 91-103, 1928.
- Larsen *et al.*, Proc Natl. Acad. Sci. USA., 83: 8283, 1986, 1963.
- Laspia *et al.*, Cell, 59: 283, 1989.
- 30 Latimer *et al.*, Mol. Cell. Biol., 10: 760, 1990.
- Lattar *et al.*, Infect Immun. 77: 1968-1975, 2009.
- Lee *et al.*, Nature, 294: 228, 1981.
- Lee *et al.*, Nucleic Acids Res., 12: 4191-206, 1984.
- Lee *et al.*, J Infect Dis. 156: 741-750, 1987.
- 35 Lee, Trends Microbiol. 4 (4): 162-166, 1996.
- Levenson *et al.*, Hum. Gene Ther., 9 (8): 1233-1236, 1998.
- Levine MM, editor. New generation vaccines. 4^a ed. Nueva York: Informa Healthcare USA. xxvii, 1011, 2010
- Levinson *et al.*, Nature, 295: 79, 1982.
- Lin *et al.*, Mol. Cell. Biol., 10: 850, 1990.
- 40 Lin *et al.*, J Bacteriol. 176: 7005-7016, 1994.
- Liu *et al.*, Clin Infect Dis. 52: 285-292, 2011.
- Loeb, J Med Res. 10: 407-419, 1903.
- Lominski, J Gen Microbiol. 3: ix, 1949.
- Lominski y Roberts, J Pathol Bacteriol. 58: 187-199, 1946.
- 45 Lominski *et al.*, Lancet. 1: 1315-1318, 1962.
- Loof *et al.*, Blood. 118: 2589-98, 2011.
- Lorand, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biol. 20: 2-9, 2000.
- Lord, Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biol. 31: 494-499, 2011.
- Lowy, N Engl J Med. 339: 520-532, 1998.
- 50 Luria *et al.*, EMBO J., 6: 3307, 1987.
- Lusky y Botchan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 3609, 1986.
- Lusky *et al.*, Mol. Cell. Biol., 3: 1108, 1983.
- Macejak y Sarnow, Nature, 353: 90-94, 1991.
- MacGurn *et al.*, Mol. Microbiol., 57: 1653-1663, 2005.
- 55 Mainiero *et al.*, J Bacteriol. 192: 613-623, 2010.
- Maira-Litran *et al.*, Infect. Immun., 70: 4433-4440, 2002.
- Maira-Litran *et al.*, Vaccine, 22: 872-879, 2004.
- Majors y Varmus, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 5866, 1983.
- Markwardt F (1955) Untersuchungen über Hirudin: naturwiss. F, 1955.
- 60 Markwardt, Untersuchungen über Hirudin. Naturwissenschaften, 41: 537-538, 1955.
- Mazmanian *et al.*, Mol. Microbiol., 40 (5): 1049-1057, 2001.
- Mazmanian *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 5510-5515, 2000.
- Mazmanian *et al.*, Science, 285 (5428): 760-3, 1999.
- Mazmanian *et al.*, Science. 299: 906-909, 2003.
- 65 McAdow *et al.*, PLoS Pathogens. 7: e1002307, 2011.
- McAdow *et al.*, J Inn Immun. 4: 141-148, 2012.

- McAdow *et al.*, Coagulases as determinants of protective immune responses against *Staphylococcus aureus*. en preparación, 2012.
- McAleese *et al.*, Microbiology. 149: 99-109, 2003.
- McCarthy y Lindsay, BMC Microbiol. 10: 173, 2010.
- 5 McDevitt *et al.*, MolMicrobiol. 16: 895-907, 1995.
- McDevitt *et al.*, Euro J Biochem/FEBS. 247: 416-424, 1997.
- McDevitt *et al.*, MolMicrobiol. 11: 237-248, 1994.
- McLaughlin *et al.*, PLoS Pathog., 3: e105, 2007.
- McNeall *et al.*, Gene, 76: 81, 1989.
- 10 Melles *et al.*, FEMSImmunol Med Microbiol. 52: 287-292, 2008.
- Mernaugh *et al.*, en: Molecular Methods in Plant Pathology, Singh *et al.* (Eds.), CRC Press Inc., Boca Ratón, FL, 359-365, 1995.
- Merrifield, Science, 232 (4748): 341-347, 1986.
- Miksicek *et al.*, Cell, 46: 203, 1986.
- 15 Mora *et al.*, PNAS USA. 102: 15641-15646, 2005.
- Mordacq y Linzer, Genes and Dev., 3: 760, 1989.
- Moreau *et al.*, Carbohydrate Res., 201: 285-297, 1990.
- Moreau *et al.*, Nucl. Acids Res., 9: 6047, 1981.
- Moreillon *et al.*, Infect Immun. 63: 4738-4743, 1995.
- 20 Mosmann y Coffman, Ann. Rev. Immunol., 7: 145-173, 1989.
- Much, Biochem Z. 14: 143-155, 1908.
- Muesing *et al.*, Cell, 48: 691, 1987.
- Musher *et al.*, Medicine (Baltimore), 73: 186-208, 1994.
- Mutch *et al.*, Blood. 115: 3980-3988, 2010.
- 25 Navarra y Schneewind, J. Biol. Chem., 274: 15847-15856, 1999.
- Na'was T, *et al.*, J Clin Immunol. 36: 414-420, 1998.
- Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol., 48: 443, 1970.
- Ng *et al.*, Nuc. Acids Res., 17: 601, 1989.
- Ni Eidhin *et al.*, Mol Microbiol. 30: 245-257, 1998.
- 30 Nicolau y Sene, Biochim. Biophys. Acta, 721: 185-190, 1982.
- Nicolau *et al.*, Methods Enzymol., 149: 157-176, 1987.
- Niemann *et al.*, Circulation. 110: 193-200, 2004.
- Nilsson *et al.*, J Clin Invest. 101: 2640-2649, 1998.
- Noble *et al.*, FEMS Microbiol Lett. 72: 195-198, 1992.
- 35 Novick, Mol. Microbiol., 48: 1429-1449, 2003.
- Nuccitelli *et al.*, PNAS USA. 108: 10278-10283, 2011.
- O'Seaghdha *et al.*, FEBS J. 273: 4831-4841, 2006.
- O'Brien *et al.*, Mol Microbiol. 44: 1033-1044, 2002.
- Omirehleh *et al.*, Plant Mol. Biol., 21 (3): 415-28, 1993.
- 40 Ondek *et al.*, EMBO J., 6: 1017, 1987.
- Ornitz *et al.*, Mol. Cell. Biol., 7: 3466, 1987.
- O'Seaghdha *et al.* FEBS J. 273: 4831-4841, 2006.
- Pallen, Trends Microbiol., 10: 209-212, 2002.
- Palma *et al.*, Infect Immun. 64: 5284-5289, 1996.
- 45 Palma *et al.*, J Biol Chem. 276: 31691-31697, 2001.
- Palma *et al.*, J Biol Chem. 273: 13177-13181, 1998.
- Palmiter *et al.*, Nature, 300: 611, 1982.
- Palmqvist *et al.*, Microbes. Infect., 7: 1501-11, 2005.
- Palmqvist *et al.*, Microbes Infect. 6: 188-195, 2004.
- 50 Panizzi *et al.*, J. Biol. Chem., 281: 1179-1187, 2006.
- Panizzi *et al.*, Cell Mol Life Sci. 61: 2793-2798, 2004.
- Panizzi *et al.*, Nat Med. 17: 1142-1146, 2011.
- Patel *et al.*, Infect Contr Hosp Epidemiol. 32: 881-888, 2011.
- Paul-Satyaseela *et al.*, Epidemiol Infect. 132: 831-838, 2004.
- 55 Solicitud PCT WO 89/09284
- Solicitud PCT WO 00/02523
- Solicitud PCT WO 00/12132
- Solicitud PCT WO 00/12689
- Solicitud PCT WO 00/15238
- 60 Solicitud PCT WO 01/34809
- Solicitud PCT WO 01/60852
- Solicitud PCT WO 01/98499
- Solicitud PCT WO 02/059148
- Solicitud PCT WO 02/094868
- 65 Solicitud PCT WO 03/53462
- Solicitud PCT WO 04/43407

- Solicitud PCT WO 06/032472
 Solicitud PCT WO 06/032475
 Solicitud PCT WO 06/032500
 Solicitud PCT WO 07/113222
 5 Solicitud PCT WO 07/113223
 Solicitud PCT WO 94/09699
 Solicitud PCT WO 95/06128
 Solicitud PCT WO 95/08348
 Solicitud PCT WO 98/57994
 10 Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 2444, 1988.
 Pech *et al.*, Mol. Cell. Biol., 9: 396, 1989.
 Pelletier y Sonenberg, Nature, 334 (6180): 320-325, 1988.
 Pérez-Stable y Constantini, Mol. Cell. Biol., 10: 1116, 1990.
 Peterson *et al.*, Infect Immun. 15: 760-764, 1997.
 15 Phonimdaeng *et al.*, J Gen Microbiol. 134: 75-83, 1988.
 Phonimdaeng *et al.*, Mol Microbiol. 4: 393-404, 1990.
 Picard y Schaffner, Nature, 307: 83, 1984.
 Pinkert *et al.*, Genes and Dev., 1: 268, 1987.
 Plotkin, SA, Orenstein WA, editores (2004) Vaccines. 4ª ed. Filadelfia, Pa.: Saunders, xxi, 1662 p. p. 2004
 20 Ponta *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 1020, 1985.
 Porton *et al.*, Mol. Cell. Biol., 10: 1076, 1990.
 Potrykus *et al.*, Mol. Gen. Genet., 199 (2): 169-177, 1985.
 Powers *et al.*, J Infect Dis. Doi: 10.1093/infdis/jis192, 2012.
 Procyk y Blomback, Biochemistry. 29: 1501-1507, 1990.
 25 Projan *et al.*, Curr Opin Pharmacol. 6: 473-479, 2006.
 Pugsley, Microbiol. Rev., 57: 50-108, 1993.
 Pym *et al.*, Mol. Microbiol., 46: 709-717, 2002.
 Pym *et al.*, Nat. Med., 9: 533-539, 2003.
 Que, *et al.*, Infect Immun. 68: 3516-3522, 2000.
 30 Queen y Baltimore, Cell, 35: 741, 1983.
 Quinn *et al.*, Mol. Cell. Biol., 9: 4713, 1989.
 Rammekamp *et al.*, J Exp Med. 91: 295-307, 1950.
 Rammekamp *et al.*, Ann NY Acad Sci. 65: 144-151, 1956.
 Redondo *et al.*, Science, 247: 1225, 1990.
 35 Reisman y Rotter, Mol. Cell. Biol., 9: 3571, 1989.
 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. Mack Printing Company, 1289-1329, 1990.
 Resendez Jr. *et al.*, Mol. Cell. Biol., 8: 4579, 1988.
 Rijken y Lijnen, J Thrombosis & Haemostasis. 7: 4-13, 2009.
 Ripe *et al.*, Mol. Cell. Biol., 9: 2224, 1989.
 40 Rippe *et al.*, Mol. Cell Biol., 10: 689-695, 1990.
 Rittling *et al.*, Nuc. Acids Res., 17: 1619, 1989.
 Roben *et al.*, J. Immunol. 154: 6437-6445, 1995.
 Rogers *et al.*, Ann NY Acad Sci. 128: 274-284, 1965.
 Rooijackers *et al.*, Nature Immunol. 6: 920-927, 2005.
 45 Rosen *et al.*, Cell, 41: 813, 1988.
 Rothfork *et al.*, J Immunol. 171: 5389-5395, 2003.
 Ryan, K. J., y Ray, C. G. (Eds.). Sherris Medical Microbiology: An Introduction to Infectious Disease. (cuarta edición, ed.). Nueva York: McGraw-Hill, 2004.
 Sakai *et al.*, Genes and Dev., 2: 1144, 1988.
 50 Sakharov *et al.* J Biol Chem. 271: 27912-27918, 1996.
 Salid-Salim *et al.*, Infect. Control Hosp. Epidemiol. 24: 451-455, 2003.
 Sambrook *et al.*, en: Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001.
 Saravolatz *et al.*, Ann Int Med. 97: 325-329, 1982.
 Sawai *et al.*, Infect Immunity. 65: 466-471, 1997.
 55 Schaffner *et al.*, J. Mol. Biol., 201: 81, 1988.
 Schneewind *et al.*, Cell 70: 267-281, 1992.
 Schneewind *et al.*, EMBO, 12: 4803-4811, 1993.
 Schneewind y Missiakas, PNAS USA. 108: 10029-10030, 2011.
 Schneewind *et al.*, Science. 268: 103-106, 1995.
 60 Searle *et al.*, Mol. Cell. Biol., 5: 1480, 1985.
 Seki *et al.*, Microbiol Immunol. 33: 981-990, 1989.
 Sharp y Marciniak, Cell, 59: 229, 1989.
 Shaul y Ben-Levy, EMBO J., 6: 1913, 1987.
 Shaw *et al.*, Microbiology, 150: 217-228, 2004.
 65 Sheagren, N. Engl. J. Med. 310: 1368-1373, 1984.
 Sherman *et al.*, Mol. Cell. Biol., 9: 50, 1989.

- Shinefield *et al.*, New England J Med. 346: 491-496, 2002.
 Shopsin *et al.*, J. Clin. Microbiol., 37: 3556-63, 1999.
 Sibbald *et al.*, Microbiol. Mol Biol. Rev., 70: 755-788, 2006.
 Sievert *et al.*, Clin Infect Dis. 46: 668-674, 2008.
 5 Silberman *et al.*, Brit J Haematol. 24: 101-113, 1973.
 Silverman y Goodyear. Nat. Rev. Immunol., 6: 465-75, 2006.
 Sjodahl, Eur. J. Biochem. 73: 343-351, 1977.
 Sjoquist *et al.*, Eur. J. Biochem. 30: 190-194, 1972.
 Sleight y Lockett, J. EMBO, 4: 3831, 1985.
 10 Smith y Waterman, Adv. Appl. Math., 2: 482, 1981.
 Smith y Johnstone. Nature. 178: 982-983, 1956.
 Smith *et al.*, Brit. J. Exp. Pathol., 28: 57, 1947.
 Sorensen *et al.*, Infect. Immun., 63: 1710-1717, 1995.
 Soulier *et al.*, Thrombosis et diathesis haemorrhagica. 17: 321-334, 1967.
 15 Spalholz *et al.*, Cell, 42: 183, 1985.
 Spandau y Lee, J. Virology, 62: 427, 1988.
 Spandidos y Wilkie, EMBO J., 2: 1193, 1983.
 Spink *et al.*, J Clin Invest. 21: 353-356, 1942.
 Stanley *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100: 13001-13006, 2003.
 20 Stephens y Hentschel, Biochem. J., 248: 1, 1987.
 Stewart y Young, en: Solid Phase Peptide Synthesis, 2^a ed., Pierce Chemical Co., 1984.
 Stranger-Jones *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 103: 16942-16947, 2006.
 Streitfeld *et al.*, Nature. 184 (supl 21): 1665-1666, 1959.
 Strong *et al.*, Biochem. 21: 1414-1420, 1982.
 25 Stuart *et al.*, Nature, 317: 828, 1985.
 Studier *et al.*, Methods Enzymol. 185: 60-89 1990.
 Stutzmann *et al.*, Infect Immun. 69: 657-664, 2001.
 Sullivan y Peterlin, Mol. Cell. Biol., 7: 3315, 1987.
 Sutter *et al.*, FEMS Immunol Med Microbiol. 63: 16-24, 2011.
 30 Swartzendruber y Lehman, J. Cell. Physiology, 85: 179, 1975.
 Tager y Drumman, Ann NY Acad Sci. 128: 92-111, 1965.
 Tager y Hales, J Immunol. 60: 1-9, 1948.
 Takebe *et al.*, Mol. Cell. Biol., 8: 466, 1988.
 Tam *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 105: 6442, 1983.
 35 Tavernier *et al.*, Nature, 301: 634, 1983.
 Taylor y Kingston, Mol. Cell. Biol., 10: 165, 1990a.
 Taylor y Kingston, Mol. Cell. Biol., 10: 176, 1990b.
 Taylor *et al.*, J. Biol. Chem., 264: 15160, 1989.
 Tenover *et al.*, Antimicrob Agents Chemother. 56: 1324-1330, 2012.
 40 Thammaravongsa *et al.*, J Exp Med. 206: 2417-2427, 2009.
 Thiesen *et al.*, J. Virology, 62: 614, 1988.
 Thomson *et al.*, J. Immunol., 157 (2): 822-826, 1996.
 Tigges *et al.*, J. Immunol., 156 (10): 3901-3910, 1996.
 Ton-That *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96 (22): 12424-9, 1999.
 45 Treisman, Cell, 42: 889, 1985.
 Tronche *et al.*, Mol. Biol. Med., 7: 173, 1990.
 Trudel y Constantini, Genes and Dev., 6: 954, 1987.
 Tuchscher *et al.*, Infect Immun. 73: 7932-7937, 2005.
 Tyndell *et al.*, Nuc. Acids. Res., 9: 6231, 1981.
 50 Uhlen *et al.*, J. Biol. Chem. 259: 1695-1702 y 13628 (Corr.) 1984.
 Umeda *et al.*, J Bacteriol. 141: 838-844, 1980.
 van den Ent y Lowe, FEBS Lett., 579: 3837-3841, 2005.
 van Wely *et al.*, FEMS Microbiol. Rev., 25: 437-454, 2001.
 Vanassche *et al.*, J Clin Microbiol. 48: 4248-4250, 2010.
 55 Vanassche *et al.*, J Thrombosis Haemostasis. 9: 2436-2446, 2011.
 Vanassche *et al.*, J Thrombosis Haemostasis. 107, 2012.
 Vannice y Levinson, J. Virology, 62: 1305, 1988.
 Vasseur *et al.*, Proc Natl. Acad. Sci. USA, 77: 1068, 1980.
 Vaughan *et al.*, Nat. Biotech. 16: 535-539, 1998.
 60 Walker y Nesheim, J Biol Chem. 274: 5201-5212, 1999.
 Walsh, Science. 261: 308-309, 1993.
 Walsh *et al.*, Microbiol. 154: 550-558, 2008.
 Walsh, Am J Med. 4: 782-782, 2010.
 Wang y Calame, Cell, 47: 241, 1986.
 65 Wang *et al.*, PLoS Pathogens. 6: e1000763, 2010.
 Ware *et al.*, Protein Sci. 8: 2663-2671, 1999.

Watanabe *et al.*, PLoS One. S, 4: e5714, 2009.
 Watanabe *et al.*, J Bacteriol. 187: 3698-3707, 2005.
 Weber *et al.*, Cell, 36: 983, 1984.
 Weems *et al.*, Antimicrob Agents Chemother. 50: 2751-2755, 2006.
 5 Weidenmaier *et al.*, Nature Med. 10: 243-245, 2004.
 Weigel *et al.*, Science. 302: 1569-1571, 2003.
 Weinberger *et al.* Mol. Cell. Biol., 8: 988, 1984.
 Weiss *et al.*, J. Antimicrob. Chemother., 53 (3): 480-6, 2004.
 Wilke *et al.*, PNAS USA. 107: 13473-13478, 2010.
 10 Winoto y Baltimore, Cell, 59: 649, 1989.
 Wolberg, Haemophilia. 16 Supl 3: 7-12, 2010.
 Wong *et al.*, Gene, 10: 87-94, 1980.
 Xu *et al.*, J. Infect. Dis., 189: 2323-2333, 2004.
 Xu *et al.*, Mol. Microbiol., 66 (3): 787-800, 2007.
 15 Yang *et al.*, PNAS USA. 97: 14156-14161, 2000.
 Yeaman *et al.*, Antimicrobial Agents Chemotherapy. 36: 1665-1670, 1992.
 Yutzey *et al.* Mol. Cell. Biol., 9: 1397, 1989.
 Zajdel, Thrombosis Red. 6: 501-510, 1975.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> McAdow, Molly
 Dedent, Andrea
 Cheng, Alice
 25 Emolo, Carla
 Missiakas, Dominique
 Schneewind, Olaf

<120> ANTÍGENOS DE COAGULASA ESTAFILOCÓCICA Y MÉTODOS PARA SU USO

<130> ARCD.P0536WO

<140>
 DESCONOCIDA
 35 <141> CON LA PRESENTE

<150> 61/638.831
 <151> 26/04/2012

40 <150> 61/674.619
 <151> 23/07/2012

<160> 87

45 <170> PatentIn versión 3,5

<210> 1
 <211> 41
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador sintético

55 <400> 1
 cgcggtatcca tagtaacaaa ggattatagt aaagaatcaa g 41

<210> 2
 <211> 33
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador sintético

65 <400> 2

ES 2 806 945 T3

	tcccccggt tatttgta ctctaggccc ata	33
5	<210> 3 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 3 cgcgatcca tagtaacaaa ggattatagt gggaaa	36
15	<210> 4 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador sintético	
25	<400> 4 tcccccggt tatttgta ctctaggccc ata	33
30	<210> 5 <211> 43 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador sintético	
35	<400> 5 cgcgatcca tagtaactaa agattatagt aaagaatcaa gag	43
40	<210> 6 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador sintético	
45	<400> 6 tcccccggt tatttgta ctctaggacc atatgtc	37
50	<210> 7 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador sintético	
55	<400> 7 cgcgatcca tagtaacaaa ggattatagt gggaaat	37
60	<210> 8 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 8	

ES 2 806 945 T3

	tcccccggt tatttgta ctctaggccc ata	33
5	<210> 9 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 9 cgcgatcca tagtaacaaa ggattatagt gggaaat	37
15	<210> 10 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador sintético	
25	<400> 10 tcccccggt tatttgta ctctaggacc atatgtc	37
30	<210> 11 <211> 43 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador sintético	
35	<400> 11 cgcgatcca tagtaactaa agattatagt aaagaatcaa gag	43
40	<210> 12 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador sintético	
45	<400> 12 tcccccggt tatttgta ctctaggacc atatgtc	37
50	<210> 13 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador sintético	
55	<400> 13 ccgctcgagg tggttctgg ggagaag	27
60	<210> 14 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 14	

ES 2 806 945 T3

	cgggatcctt attgccatt atatacttta ttgattt	37
5	<210> 15 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 15 ccgctcgagg tggttctgg ggagaag	27
15	<210> 16 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador sintético	
25	<400> 16 cgggatcctt attgccatt gtatacttta ttg	33
30	<210> 17 <211> 44 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 17 catgccatgg cctaggatag taacaaagga ttatagtggg aaat	44
40	<210> 18 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 18 cgggatcctt atttgttac tctaggccca ta	32
50	<210> 19 <211> 45 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 19 catgccatgg ctcgagatag taacaaagga ttatagtaaa gaatc	45
60	<210> 20 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 20	

ES 2 806 945 T3

	cctaggcgga ccatattgag aagc	24
5	<210> 21 <211> 43 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 21 catgccatgg ccgcgatag taacaaagga ttatagtggg aaa	43
15	<210> 22 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador sintético	
25	<400> 22 ggctcgagtt tttgacagt ttatttttc ca	32
30	<210> 23 <211> 50 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador sintético	
35	<400> 23 catgccatgg cccgggatag taactaaaga ttatagtaaa gaatcaagag	50
40	<210> 24 <211> 38 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador sintético	
45	<400> 24 tccccgcgga ttttgacgg ttctgtttt ccaagatt	38
50	<210> 25 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador sintético	
55	<400> 25 catgccatgg cctagggtgg ttctgggga gaag	34
60	<210> 26 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 26	

ES 2 806 945 T3

	cgggatcctt attgccatt atatacttta ttgattt	37
5	<210> 27 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 27 catgccatgg ctcgaggtgg ttctgggga gaag	34
15	<210> 28 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador sintético	
25	<400> 28 cctaggtgta ttgttaaagt cctttaaac ac	32
30	<210> 29 <211> 76 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 29 catgccatgg gcagcagcca tcatcatcat catcacagca gcatagtaac taaagattat	60
35	agtaaagaat caagag	76
40	<210> 30 <211> 60 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador sintético	
45	<400> 30 catgccatgg gcagcagcca tcatcatcat catcacagca gcgtggttc tggggagaag	60
50	<210> 31 <211> 56 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 31 cgggatcctt actctcaaa ttgaggatga gaccatttg ttacttagg cccata	56
60	<210> 32 <211> 61 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

ES 2 806 945 T3

<220>

<223> Cebador sintético

<400> 32

5
cgggacccctt acttctcaaa ttgaggatga gaccatttgc cattatatac tttattgatt 60
t 61

<210> 33

<211> 282

10 <212> PRT

<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 33

Ile Val Thr Lys Asp Tyr Ser Lys Glu Ser Arg Val Asn Glu Asn Ser
1 5 10 15
Lys Tyr Asp Thr Pro Ile Pro Asp Trp Tyr Leu Gly Ser Ile Leu Asn
20 25 30
Arg Leu Gly Asp Gln Ile Tyr Tyr Ala Lys Glu Leu Thr Asn Lys Tyr
35 40 45
Glu Tyr Gly Glu Lys Glu Tyr Lys Gln Ala Ile Asp Lys Leu Met Thr
50 55 60
Arg Val Leu Gly Glu Asp His Tyr Leu Leu Glu Lys Lys Lys Ala Gln
15 65 70 75 80

ES 2 806 945 T3

```

Tyr Glu Ala Tyr Lys Lys Trp Phe Glu Lys His Lys Ser Glu Asn Pro
      85                      90                      95

His Ser Ser Leu Lys Lys Ile Lys Phe Asp Asp Phe Asp Leu Tyr Arg
      100                    105                    110

Leu Thr Lys Lys Glu Tyr Asn Glu Leu His Gln Ser Leu Lys Glu Ala
      115                    120                    125

Val Asp Glu Phe Asn Ser Glu Val Lys Asn Ile Gln Ser Lys Gln Lys
      130                    135                    140

Asp Leu Leu Pro Tyr Asp Glu Ala Thr Glu Asn Arg Val Thr Asn Gly
      145                    150                    155                    160

Ile Tyr Asp Phe Val Cys Glu Ile Asp Thr Leu Tyr Ala Ala Tyr Phe
      165                    170                    175

Asn His Ser Gln Tyr Gly His Asn Ala Lys Glu Leu Arg Ala Lys Leu
      180                    185                    190

Asp Ile Ile Leu Gly Asp Ala Lys Asp Pro Val Arg Ile Thr Asn Glu
      195                    200                    205

Arg Ile Arg Lys Glu Met Met Asp Asp Leu Asn Ser Ile Ile Asp Asp
      210                    215                    220

Phe Phe Met Asp Thr Asn Met Asn Arg Pro Leu Asn Ile Thr Lys Phe
      225                    230                    235                    240

Asn Pro Asn Ile His Asp Tyr Thr Asn Lys Pro Glu Asn Arg Asp Asn
      245                    250                    255

Phe Asp Lys Leu Val Lys Glu Thr Arg Glu Ala Ile Ala Asn Ala Asp
      260                    265                    270

Glu Ser Trp Lys Thr Arg Thr Val Lys Asn
      275                    280

```

<210> 34
 <211> 279
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 34

```

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

```

ES 2 806 945 T3

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

ES 2 806 945 T3

Lys Asn Lys Thr Val Lys Lys
275

<210> 35
<211> 279
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 35

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

Lys Asn Gly Lys Gln Ile Ala Asp Gly Tyr Tyr Trp Gly Ile Ile Glu
20 25 30

Asn Leu Glu Asn Gln Phe Tyr Asn Ile Phe His Leu Leu Asp Gln His
35 40 45

Lys Tyr Ala Glu Lys Glu Tyr Lys Asp Ala Leu Asp Lys Leu Lys Thr
50 55 60

Arg Val Leu Glu Glu Asp Gln Tyr Leu Leu Glu Arg Lys Lys Glu Lys
65 70 75 80

Tyr Glu Ile Tyr Lys Glu Leu Tyr Lys Lys Tyr Lys Lys Glu Asn Pro
85 90 95

Asn Thr Gln Val Lys Met Lys Ala Phe Asp Lys Tyr Asp Leu Gly Asp
100 105 110

Leu Thr Met Glu Glu Tyr Asn Asp Leu Ser Lys Leu Leu Thr Lys Ala
115 120 125

Leu Asp Asn Phe Lys Leu Glu Val Lys Lys Ile Glu Ser Glu Asn Pro
130 135 140

Asp Leu Arg Pro Tyr Ser Glu Ser Glu Glu Arg Thr Ala Tyr Gly Lys
145 150 155 160

Ile Asp Ser Leu Val Asp Gln Ala Tyr Ser Val Tyr Phe Ala Tyr Val
165 170 175

Thr Asp Ala Gln His Lys Thr Glu Ala Leu Asn Leu Arg Ala Lys Ile
180 185 190

Asp Leu Ile Leu Gly Asp Glu Lys Asp Pro Ile Arg Val Thr Asn Gln
195 200 205

ES 2 806 945 T3

Arg Thr Glu Lys Glu Met Ile Lys Asp Leu Glu Ser Ile Ile Asp Asp
210 215 220

Phe Phe Ile Glu Thr Lys Leu Asn Arg Pro Gln His Ile Thr Arg Tyr
225 230 235 240

Asp Gly Thr Lys His Asp Tyr His Lys His Lys Asp Gly Phe Asp Ala
245 250 255

Leu Val Lys Glu Thr Arg Glu Ala Val Ser Lys Ala Asp Glu Ser Trp
260 265 270

Lys Thr Lys Thr Val Lys Lys
275

<210> 36

<211> 277

<212> PRT

<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 36

Ile Val Thr Lys Asp Tyr Ser Lys Glu Ser Arg Val Asn Glu Lys Ser
1 5 10 15

Lys Lys Gly Ala Thr Val Ser Asp Tyr Tyr Tyr Trp Lys Ile Ile Asp
20 25 30

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

Lys Tyr Gly Asp Pro Ile Tyr Lys Glu Ala Lys Asp Arg Leu Met Thr
50 55 60

Arg Val Leu Gly Glu Asp Gln Tyr Leu Leu Lys Lys Lys Ile Asp Glu
65 70 75 80

Tyr Glu Leu Tyr Lys Lys Trp Tyr Lys Ser Ser Asn Lys Asn Thr Asn
85 90 95

Met Leu Thr Phe His Lys Tyr Asn Leu Tyr Asn Leu Thr Met Asn Glu
100 105 110

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

Lys Glu Val Lys Glu Ile Glu His Lys Asn Val Asp Leu Lys Gln Phe
130 135 140

Asp Lys Asp Gly Glu Asp Lys Ala Thr Lys Glu Val Tyr Asp Leu Val
145 150 155 160

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

Gly Glu His Ala Lys Glu Leu Arg Ala Lys Leu Asp Leu Ile Leu Gly
180 185 190

Asp Thr Asp Asn Pro His Lys Ile Thr Asn Glu Arg Ile Lys Lys Glu
195 200 205

Met Ile Asp Asp Leu Asn Ser Ile Ile Asp Asp Phe Phe Met Glu Thr
210 215 220

Lys Gln Asn Arg Pro Asn Ser Ile Thr Lys Tyr Asp Pro Thr Lys His
225 230 235 240

Asn Phe Lys Glu Lys Ser Glu Asn Lys Pro Asn Phe Asp Lys Leu Val
245 250 255

Glu Glu Thr Lys Lys Ala Val Lys Glu Ala Asp Glu Ser Trp Lys Asn
260 265 270

Lys Thr Val Lys Lys
275

<210> 37
<211> 282
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 37

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

Lys Asn Gly Thr Leu Ile Asp Ser Arg Tyr Leu Asn Ser Ala Leu Tyr
20 25 30

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

Glu Tyr Gly Asp Asn Ile Tyr Lys Glu Ala Lys Asp Arg Leu Leu Glu
50 55 60

Lys Val Leu Arg Glu Asp Gln Tyr Leu Leu Glu Arg Lys Lys Ser Gln
65 70 75 80

ES 2 806 945 T3

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

<210> 38
 <211> 135
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 38

Val Val Ser Gly Glu Lys Asn Pro Tyr Val Ser Lys Ala Leu Glu Leu
 1 5 10 15

ES 2 806 945 T3

Lys Asp Lys Ser Asn Lys Ser Asn Ser Tyr Glu Asn Tyr Arg Asp Ser
 20 25 30
 Leu Glu Ser Leu Ile Ser Ser Leu Ser Phe Ala Asp Tyr Glu Lys Tyr
 35 40 45
 Glu Glu Pro Glu Tyr Glu Lys Ala Val Lys Lys Tyr Gln Gln Lys Phe
 50 55 60
 Met Ala Glu Asp Asp Ala Leu Lys Asn Phe Leu Asn Glu Glu Lys Lys
 65 70 75 80
 Ile Lys Asn Ala Asp Ile Ser Arg Lys Ser Asn Asn Leu Leu Gly Leu
 85 90 95
 Thr His Glu Arg Tyr Ser Tyr Ile Phe Asp Thr Leu Lys Lys Asn Lys
 100 105 110
 Gln Glu Phe Leu Lys Asp Ile Glu Glu Ile Gln Leu Lys Asn Ser Asp
 115 120 125
 Leu Lys Asp Phe Asn Asn Thr
 130 135

<210> 39
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*

<400> 39

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

ES 2 806 945 T3

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

Phe Leu Lys Glu Ile Glu Asp Ile Lys Lys Asp Asn Pro Glu Leu Lys
115 120 125

Asp Phe Asn Glu
130

<210> 40

<211> 482

<212> PRT

<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 40

Val Val Ser Gly Glu Lys Asn Pro Tyr Val Ser Glu Ser Leu Lys Leu
1 5 10 15

Thr Asn Asn Lys Asn Lys Ser Arg Thr Val Glu Glu Tyr Lys Lys Ser
20 25 30

Leu Asp Asp Leu Ile Trp Ser Phe Pro Asn Leu Asp Asn Glu Arg Phe
35 40 45

Asp Asn Pro Glu Tyr Lys Glu Ala Met Lys Lys Tyr Gln Gln Arg Phe
50 55 60

Met Ala Glu Asp Glu Ala Leu Lys Lys Phe Phe Ser Glu Glu Lys Lys
65 70 75 80

Ile Lys Asn Gly Asn Thr Asp Asn Leu Asp Tyr Leu Gly Leu Ser His
85 90 95

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

Phe Leu Lys Glu Ile Glu Asp Ile Lys Lys Asp Asn Pro Glu Leu Lys
115 120 125

Asp Phe Asn Glu Glu Glu Gln Leu Lys Cys Asp Leu Glu Leu Asn Lys
130 135 140

Leu Glu Asn Gln Ile Leu Met Leu Gly Lys Thr Phe Tyr Gln Asn Tyr
145 150 155 160

Arg Asp Asp Val Glu Ser Leu Tyr Ser Lys Leu Asp Leu Ile Met Gly
165 170 175

ES 2 806 945 T3

Tyr	Lys	Asp	Glu	Glu	Arg	Ala	Asn	Lys	Lys	Ala	Val	Asn	Lys	Arg	Met	180	185	190	
Leu	Glu	Asn	Lys	Lys	Glu	Asp	Leu	Glu	Thr	Ile	Ile	Asp	Glu	Phe	Phe	195	200	205	
Ser	Asp	Ile	Asp	Lys	Thr	Arg	Pro	Asn	Asn	Ile	Pro	Val	Leu	Glu	Asp	210	215	220	
Glu	Lys	Gln	Glu	Glu	Lys	Asn	His	Lys	Asn	Met	Ala	Gln	Leu	Lys	Ser	225	230	235	240
Asp	Thr	Glu	Ala	Ala	Lys	Ser	Asp	Glu	Ser	Lys	Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	245	250	255	
Lys	Arg	Ser	Leu	Asn	Thr	Gln	Asn	His	Lys	Pro	Ala	Ser	Gln	Glu	Val	260	265	270	
Ser	Glu	Gln	Gln	Lys	Ala	Glu	Tyr	Asp	Lys	Arg	Ala	Glu	Glu	Arg	Lys	275	280	285	
Ala	Arg	Phe	Leu	Asp	Asn	Gln	Lys	Ile	Lys	Lys	Thr	Pro	Val	Val	Ser	290	295	300	
Leu	Glu	Tyr	Asp	Phe	Glu	His	Lys	Gln	Arg	Ile	Asp	Asn	Glu	Asn	Asp	305	310	315	320
Lys	Lys	Leu	Val	Val	Ser	Ala	Pro	Thr	Lys	Lys	Pro	Thr	Ser	Pro	Thr	325	330	335	
Thr	Tyr	Thr	Glu	Thr	Thr	Thr	Gln	Val	Pro	Met	Pro	Thr	Val	Glu	Arg	340	345	350	
Gln	Thr	Gln	Gln	Gln	Ile	Ile	Tyr	Asn	Ala	Pro	Lys	Gln	Leu	Ala	Gly	355	360	365	
Leu	Asn	Gly	Glu	Ser	His	Asp	Phe	Thr	Thr	Thr	His	Gln	Ser	Pro	Thr	370	375	380	
Thr	Ser	Asn	His	Thr	His	Asn	Asn	Val	Val	Glu	Phe	Glu	Glu	Thr	Ser	385	390	395	400
Ala	Leu	Pro	Gly	Arg	Lys	Ser	Gly	Ser	Leu	Val	Gly	Ile	Ser	Gln	Ile	405	410	415	
Asp	Ser	Ser	His	Leu	Thr	Glu	Arg	Glu	Lys	Arg	Val	Ile	Lys	Arg	Glu	420	425	430	

ES 2 806 945 T3

His Val Arg Glu Ala Gln Lys Leu Val Asp Asn Tyr Lys Asp Thr His
435 440 445

Ser Tyr Lys Asp Arg Ile Asn Ala Gln Gln Lys Val Asn Thr Leu Ser
450 455 460

Glu Gly His Gln Lys Arg Phe Asn Lys Gln Ile Asn Lys Val Tyr Asn
465 470 475 480

Gly Lys

<210> 41

<211> 434

<212> PRT

<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 41

Ile Val Thr Lys Asp Tyr Ser Lys Glu Ser Arg Val Asn Glu Lys Ser
1 5 10 15

Lys Lys Gly Ala Thr Val Ser Asp Tyr Tyr Tyr Trp Lys Ile Ile Asp
20 25 30

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

Lys Tyr Gly Asp Pro Ile Tyr Lys Glu Ala Lys Asp Arg Leu Met Thr
50 55 60

Arg Val Leu Gly Glu Asp Gln Tyr Leu Leu Lys Lys Lys Ile Asp Glu
65 70 75 80

Tyr Glu Leu Tyr Lys Lys Trp Tyr Lys Ser Ser Asn Lys Asn Thr Asn
85 90 95

Met Leu Thr Phe His Lys Tyr Asn Leu Tyr Asn Leu Thr Met Asn Glu
100 105 110

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

Lys Glu Val Lys Glu Ile Glu His Lys Asn Val Asp Leu Lys Gln Phe
130 135 140

Asp Lys Asp Gly Glu Asp Lys Ala Thr Lys Glu Val Tyr Asp Leu Val
145 150 155 160

ES 2 806 945 T3

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

Gly Glu His Ala Lys Glu Leu Arg Ala Lys Leu Asp Leu Ile Leu Gly
180 185 190

Asp Thr Asp Asn Pro His Lys Ile Thr Asn Glu Arg Ile Lys Lys Glu
195 200 205

Met Ile Asp Asp Leu Asn Ser Ile Ile Asp Asp Phe Phe Met Glu Thr
210 215 220

Lys Gln Asn Arg Pro Asn Ser Ile Thr Lys Tyr Asp Pro Thr Lys His
225 230 235 240

Asn Phe Lys Glu Lys Ser Glu Asn Lys Pro Asn Phe Asp Lys Leu Val
245 250 255

Glu Glu Thr Lys Lys Ala Val Lys Glu Ala Asp Glu Ser Trp Lys Asn
260 265 270

Lys Thr Val Lys Lys Tyr Glu Glu Thr Val Thr Lys Ser Pro Val Val
275 280 285

Lys Glu Glu Lys Lys Val Glu Glu Pro Gln Leu Pro Lys Val Gly Asn
290 295 300

Gln Gln Glu Val Lys Thr Thr Ala Gly Lys Ala Glu Glu Thr Thr Gln
305 310 315 320

Pro Val Ala Gln Pro Leu Val Lys Ile Pro Gln Glu Thr Ile Tyr Gly
325 330 335

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

Gln Gly Glu Ile Val Gln Gly Pro Asp Phe Leu Thr Met Glu Gln Asn
355 360 365

Arg Pro Ser Leu Ser Asp Asn Tyr Thr Gln Pro Thr Thr Pro Asn Pro
370 375 380

Ile Leu Glu Gly Leu Glu Gly Ser Ser Ser Lys Leu Glu Ile Lys Pro
385 390 395 400

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

ES 2 806 945 T3

405

410

415

Ile Glu Val Lys Pro Gln Ala Thr Glu Thr Thr Glu Ala Ser Gln Tyr
420 425 430

Gly Pro

<210> 42

<211> 609

<212> PRT

<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 42

Met Lys Lys Gln Ile Ile Ser Leu Gly Ala Leu Ala Val Ala Ser Ser
1 5 10 15

Leu Phe Thr Trp Asp Asn Lys Ala Asp Ala Ile Val Thr Lys Asp Tyr
20 25 30

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

Asp Ser Arg Tyr Leu Asn Ser Ala Leu Tyr Tyr Leu Glu Asp Tyr Ile
50 55 60

Ile Tyr Ala Ile Gly Leu Thr Asn Lys Tyr Glu Tyr Gly Asp Asn Ile
65 70 75 80

Tyr Lys Glu Ala Lys Asp Arg Leu Leu Glu Lys Val Leu Arg Glu Asp
85 90 95

Gln Tyr Leu Leu Glu Arg Lys Lys Ser Gln Tyr Glu Asp Tyr Lys Gln
100 105 110

Trp Tyr Ala Asn Tyr Lys Lys Glu Asn Pro Arg Thr Asp Leu Lys Met
115 120 125

Ala Asn Phe His Lys Tyr Asn Leu Glu Glu Leu Ser Met Lys Glu Tyr
130 135 140

Asn Glu Leu Gln Asp Ala Leu Lys Arg Ala Leu Asp Asp Phe His Arg
145 150 155 160

Glu Val Lys Asp Ile Lys Asp Lys Asn Ser Asp Leu Lys Thr Phe Asn
165 170 175

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

ES 2 806 945 T3

180						185						190					
Glu	Ile	Asp	Thr	Leu	Val	Val	Ser	Tyr	Tyr	Gly	Asp	Lys	Asp	Tyr	Gly		
		195					200					205					
Glu	His	Ala	Lys	Glu	Leu	Arg	Ala	Lys	Leu	Asp	Leu	Ile	Leu	Gly	Asp		
	210					215					220						
Thr	Asp	Asn	Pro	His	Lys	Ile	Thr	Asn	Glu	Arg	Ile	Lys	Lys	Glu	Met		
225					230					235					240		
Ile	Asp	Asp	Leu	Asn	Ser	Ile	Ile	Asp	Asp	Phe	Phe	Met	Glu	Thr	Lys		
				245					250					255			
Gln	Asn	Arg	Pro	Lys	Ser	Ile	Thr	Lys	Tyr	Asn	Pro	Thr	Thr	His	Asn		
			260					265					270				
Tyr	Lys	Thr	Asn	Ser	Asp	Asn	Lys	Pro	Asn	Phe	Asp	Lys	Leu	Val	Glu		
		275					280					285					
Glu	Thr	Lys	Lys	Ala	Val	Lys	Glu	Ala	Asp	Asp	Ser	Trp	Lys	Lys	Lys		
	290					295					300						
Thr	Val	Lys	Lys	Tyr	Gly	Glu	Thr	Glu	Thr	Lys	Ser	Pro	Val	Val	Lys		
305					310					315					320		
Glu	Glu	Lys	Lys	Val	Glu	Glu	Pro	Gln	Ala	Pro	Lys	Val	Asp	Asn	Gln		
				325					330					335			
Gln	Glu	Val	Lys	Thr	Thr	Ala	Gly	Lys	Ala	Glu	Glu	Thr	Thr	Gln	Pro		
			340					345					350				
Val	Ala	Gln	Pro	Leu	Val	Lys	Ile	Pro	Gln	Gly	Thr	Ile	Thr	Gly	Glu		
		355					360					365					
Ile	Val	Lys	Gly	Pro	Glu	Tyr	Pro	Thr	Met	Glu	Asn	Lys	Thr	Val	Gln		
	370					375					380						
Gly	Glu	Ile	Val	Gln	Gly	Pro	Asp	Phe	Leu	Thr	Met	Glu	Gln	Ser	Gly		
385					390					395					400		
Pro	Ser	Leu	Ser	Asn	Asn	Tyr	Thr	Asn	Pro	Pro	Leu	Thr	Asn	Pro	Ile		
				405					410					415			
Leu	Glu	Gly	Leu	Glu	Gly	Ser	Ser	Ser	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Pro	Gln		
			420					425					430				

Gly Thr Glu Ser Thr Leu Lys Gly Thr Gln Gly Glu Ser Ser Asp Ile
435 440 445

Glu Val Lys Pro Gln Ala Thr Glu Thr Thr Glu Ala Ser Gln Tyr Gly
450 455 460

Pro Arg Pro Gln Phe Asn Lys Thr Pro Lys Tyr Val Lys Tyr Arg Asp
465 470 475 480

Ala Gly Thr Gly Ile Arg Glu Tyr Asn Asp Gly Thr Phe Gly Tyr Glu
485 490 495

Ala Arg Pro Arg Phe Asn Lys Pro Ser Glu Thr Asn Ala Tyr Asn Val
500 505 510

Thr Thr His Ala Asn Gly Gln Val Ser Tyr Gly Ala Arg Pro Thr Gln
515 520 525

Asn Lys Pro Ser Lys Thr Asn Ala Tyr Asn Val Thr Thr His Gly Asn
530 535 540

Gly Gln Val Ser Tyr Gly Ala Arg Pro Thr Gln Asn Lys Pro Ser Lys
545 550 555 560

Thr Asn Ala Tyr Asn Val Thr Thr His Ala Asn Gly Gln Val Ser Tyr
565 570 575

Gly Ala Arg Pro Thr Tyr Lys Lys Pro Ser Lys Thr Asn Ala Tyr Asn
580 585 590

Val Thr Thr His Ala Asp Gly Thr Ala Thr Tyr Gly Pro Arg Val Thr
595 600 605

Lys

<210> 43
<211> 447
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 43

ES 2 806 945 T3

atagtaacaa	aggattatag	tgggaaatca	caagttaatg	ctgggagtaa	aaatgggaca	60
ttaatagata	gcagatatatt	aaattcagct	ctatatatt	tgggaagacta	tataatttat	120
gctataggat	taactaataa	atatgaatat	ggagataata	tttataaaga	agctaaagat	180
aggttgttgg	aaaaggtatt	aagggaagat	caatatcttt	tggagagaaa	gaaatctcaa	240
tatgaagatt	ataaacaatg	gtatgcaa	tataaaaaag	aaaatcctcg	tacagattta	300
aaaatggcta	attttcataa	atataattta	gaagaacttt	cgatgaaaga	atacaatgaa	360
ctacaggatg	cattaaagag	agcactggat	gattttcaca	gagaagttaa	agatattaag	420
gataagaatt	cagacttgaa	aactttt				447

<210> 44
 <211> 399
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 44

aatgcagcag	aagaagataa	agcaactaag	gaagtatacg	atctcgtatc	tgaaattgat	60
acattagttg	tatcatatta	tgggtgataag	gattatgggg	agcacgcgaa	agagttacga	120
gcaaaactgg	acttaatcct	tggagatata	gacaatccac	ataaaattac	aatgaacgt	180
attaaaaaag	aatgattga	tgacttaa	tcaattattg	atgatttctt	tatggaaact	240
aaacaaaata	gaccgaaatc	tataacgaaa	tataatccta	caacacataa	ctataaaaca	300
aatagtata	ataaacctaa	ttttgataaa	ttagttgaag	aaacgaaaaa	agcagttaaa	360
gaagcagatg	attcttggaa	aaagaaaact	gtcaaaaaa			399

<210> 45
 <211> 471
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 45

ES 2 806 945 T3

tacggagaaa	ctgaaacaaa	atcgccagta	gtaaaagaag	agaagaaagt	tgaagaacct	60
caagcaccta	aagttgataa	ccaacaagag	gttaaaacta	cggctggtaa	agctgaagaa	120
acaacacaac	cagttgcaca	accattagtt	aaaattccac	agggcacaa	tacaggtgaa	180
attgtaaaag	gtccggaata	tccaacgatg	gaaaataaaa	cgggtacaagg	tgaaatcggt	240
caaggtcccg	attttctaac	aatggaacaa	agcggcccat	cattaagcaa	taattataca	300
aaccacccgt	taacgaaccc	tatttttagaa	ggtcttgaag	gtagctcatc	taaacttgaa	360
ataaaaccac	aaggtactga	atcaacgtta	aaaggtactc	aaggagaatc	aagtgatatt	420
gaagttaaac	ctcaagcaac	tgaaacaaca	gaagcttctc	aatatgggtcc	g	471

<210> 46
 <211> 435
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*

 <400> 46

agaccgcaat	ttaacaaaac	acctaaatat	gttaaataata	gagatgctgg	tacaggtatc	60
cgtgaatata	acgatggaac	atttggtatat	gaagcgagac	caagattcaa	taagccatca	120
gaaacaaatg	catataacgt	aacaacacat	gcaaatgggtc	aagtatcata	cggagctcgt	180
ccgacacaaa	acaagccaag	caaaacaaaac	gcatataacg	taacaacaca	tggaaacggc	240
caagtatcat	atggcgctcg	ccaacacaaa	aacaagccaa	gcaaaacaaa	tgcatacaac	300
gtaacaacac	atgcaaacgg	tcaagtgtca	tacggagctc	gcccagacata	caagaagcca	360
agtaaaacaa	atgcatacaa	tgtaacaaca	catgcagatg	gtactgcgac	atatgggcct	420
agagtaacaa	aataa					435

<210> 47
 <211> 510
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*

 <400> 47

atgaaaaagc aaataatttc gctaggcgca ttagcagttg catctagctt atttacatgg 60
gataacaaag cagatgcat agtaacaaag gattatagta aagaatcaag agtgaatgag 120
aaaagtaaaa agggagctac tgtttcagat tattactatt ggaaaataat tgatagttta 180
gaggcacaat ttactggagc aatagactta ttggaagatt ataaatatgg agatcctatc 240
tataaagaag cgaaagatag attgatgaca agagtattag gagaagacca gtatttatta 300
aagaaaaaga ttgatgaata tgagctttat aaaaagtggg ataaaagttc aaataagaac 360
actaatatgc ttactttcca taaatataat ctttacaatt taacaatgaa tgaatataac 420
gatattttta actctttgaa agatgcagtt tatcaattta ataaagaagt taaagaaata 480
gagcataaaa atgttgactt gaagcagttt 510

<210> 48
<211> 399
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 48

gataaagatg gagaagacaa ggcaactaaa gaagtttatg accttgtttc tgaaattgat 60
acattagttg taacttatta tgctgataag gattatgggg agcatgcgaa agagttacga 120
gcaaaactgg acttaatcct tggagataca gacaatccac ataaaattac aaatgagcgt 180
ataaaaaaag aaatgatcga tgacttaaat tcaattatag atgatttctt tatggagact 240
aaacaaaata gaccgaattc tataacaaaa tatgatccaa caaacacaa ttttaaagag 300
aagagtgaat ataaacctaa ttttgataaa ttagttgaag aaacaaaaaa agcagttaaa 360
gaagcagacg aatcttgga aaataaaact gtcaaaaaa 399

<210> 49
<211> 471
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 49

tacgaggaaa	ctgtaacaaa	atctcctggt	gtaaaagaag	agaagaaagt	tgaagaacct	60
caattaccta	aagttggaaa	ccagcaagag	gttaaaacta	cggctggtaa	agctgaagaa	120
acaacacaac	cagtggcaca	gccattagta	aaaattccac	aagaaacaat	ctatggtgaa	180
actgtaaaag	gtccagaata	tccaacgatg	gaaaataaaa	cgttacaagg	tgaaatcggt	240
caaggtcccg	attttctaac	aatggaacaa	aacagaccat	ctttaagcga	taattatact	300
caaccgacga	caccgaaccc	tatttttagaa	ggtcttgaag	gtagctcatc	taaacttgaa	360
ataaaaccac	aaggtactga	atcaacgttg	aaaggtattc	aaggagaatc	aagtgatatt	420
gaagttaaac	ctcaagcaac	tgaacaaca	gaagcttctc	aatatggtcc	g	471

<210> 50
 <211> 597
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 50

agaccgcaat	ttaacaaaac	acctaagtat	gtgaaatata	gagatgctgg	tacaggtatc	60
cgtgaatata	acgatggaac	atttggatat	gaagcgagac	caagattcaa	caagccaagt	120
gaaacaaatg	catacaacgt	aacgacaaat	caagatggca	cagtatcata	cggagctcgc	180
ccaacacaaa	acaagccaag	tgaacaaca	gcatataacg	taacaacaca	tgcaaagtgt	240
caagtatcat	acggtgctcg	ccaacacaa	aaaaagccaa	gcaaaacaaa	tgcatacaac	300
gtaacaacac	atgcaaattg	tcaagtatca	tatggcgctc	gcccgcacaca	aaaaaagcca	360
agcaaaacaa	atgcatataa	cgtaacaaca	catgcaaattg	gtcaagtatc	atacggagct	420
cgcccgacat	acaagaagcc	aagcgaaaca	aatgcatata	acgtaacaac	acatgcaaat	480
ggtcaagtat	catatggcgc	tcgcccgcgc	caaaaaaagc	caagcgaaac	aaacgcatat	540
aacgtaacaa	cacatgcaga	tggtactgcg	acatatgggc	ctagagtaac	aaaataa	597

<210> 51
 <211> 525
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 51

ES 2 806 945 T3

atgaaaaagc aaataatttc gctagggcgca ttagcagttg catctagctt atttacatgg	60
gataacaaaag cagatgcat agtaacaaaag gattatagtg ggaaatcaca agttaatgct	120
gggagtaaaa atgggaaaca aattgcagat ggatattatt ggggaataat tgaaaatcta	180
gaaaaccagt tttaacaatat ttttcattta ctggatcagc ataaatatgc agaaaaagaa	240
tataaagatg cagtagataa attaaaaact agagtttttag aggaagacca atacctgcta	300
gaaagaaaaa aagaaaaata cgaaatttat aaagaactat ataaaaata caaaaaagag	360
aatcctaata ctcaagttaa aatgaaagca tttgataaat acgatcttgg cgatttaact	420
atggaagaat acaatgactt atcaaaatta ttaacaaaag cattggataa ctttaagtta	480
gaagtaaaga aaattgaatc agagaatcca gatttaaaac catat	525

<210> 52
 <211> 390
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 52

tctgaaagcg aagaaagaac agcatatggt aaaatagatt cacttggtga tcaagcatat	60
agtgtatatt ttgcctacgt tacagatgca caacataaaa cagaagcatt aaatcttagg	120
gcgaaaattg atttgatttt aggtgatgaa aaagatccaa ttagagttac gaatcaacgt	180
actgaaaaag aaatgattaa agatttagaa tctattattg atgatttctt cattgaaacc	240
aagttgaata gacctaaaca cattactagg tatgatggaa ctaaacaatga ttaccataaa	300
cataaagatg gatttgatgc tctagttaaa gaaacaagag aagcggttgc aaaggctgac	360
gaatcttggg aaaataaaaac tgtcaaaaaa	390

<210> 53
 <211> 564
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 53

ES 2 806 945 T3

tacgaggaaa ctgtaacaaa atctccagtt gtaaaagaag agaagaaagt tgaagaacct	60
caatcaccta aatttgataa ccaacaagag gttaaaatta cagttgataa agctgaagaa	120
acaacacaac cagtggcaca gccattagtt aaaattccac agggcacaat tacaggtgaa	180
attgtaaaag gtccggaata tccaacgatg gaaaataaaa cgttacaagg tgaaatcggt	240
caaggtccag atttcccaac aatggaacaa aacagaccat ctttaagcga taattatact	300
caaccgacga caccgaaccc tatttttagaa ggtcttgaag gtagctcatc taaacttgaa	360
ataaaaccac aaggtactga atcaacgta aaaggtactc aaggagaatc aagtgatatt	420
gaagttaaac ctcaagcatc tgaaacaaca gaagcatcac attatccagc aagacctcaa	480
tttaacaaaa cacctaaata tgttaaatat agagatgctg gtacaggtat ccgtgaatac	540
aacgatggaa catttgata tgaa	564

<210> 54
 <211> 423
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 54

gcgagaccaa gattcaataa gccatcagaa acaaacgcat acaacgtaac gacaaatcaa	60
gatggcacag taacatatgg cgctcgccca acacaaaaca aaccaagcaa aacaaatgca	120
tacaacgtaa caacacatgc aaatggtcaa gtatcatatg gcgctcgccc gacacaaaac	180
aagccaagca aaacaaatgc atataacgta acaacacatg caaatggtca agtatcatac	240
ggagctcgcc cgacacaaaa caagccaagc aaaacaaatg catataacgt aacaacacac	300
gcaaacggtc aagtgtcata cggagctcgc ccgacataca agaagccaag taaaacaaat	360
gcatacaatg taacaacaca tgcagatggt actgcgacat atgggcctag agtaacaaaa	420
taa	423

<210> 55
 <211> 525
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 55

ES 2 806 945 T3

atgaaaaagc aaataatttc gctagggcgc ttagcagttg catctagctt atttacatgg	60
gataacaaag cagatgcat agtaactaaa gattatagta aagaatcaag agtgaatgag	120
aacagtaaat acgatacacc aattccagat tggatctag gtagtatttt aaacagatta	180
ggggatcaaa tatactacgc taaggaatta actaataaat acgaatatgg tgagaaagag	240
tataagcaag cgatagataa attgatgact agagttttgg gagaagatca ttatctatta	300
gaaaaaaaga aagcacaata tgaagcatat aaaaaatggg ttgaaaaaca taaaagtga	360
aatccacatt ctagttaaaa aaagattaaa ttgacgatt ttgatttata tagattaacg	420
aagaaagaat acaatgagtt acatcaatca ttaaaagaag ctgttgatga gtttaatagt	480
gaagtgaaaa atattcaatc taaacaaaag gatttattac cttat	525

<210> 56
 <211> 399
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 56

gatgaagcaa ctgaaaatcg agtaacaaat ggaatatatg attttgtttg cgagattgac	60
acattatacg cagcatatct taatcatagc caatatgggc ataagctaa agaattaaga	120
gcaaagctag atataattct tggatgatgc aaagatcctg ttagaattac gaatgaaaga	180
ataagaaaag aaatgatgga tgatttaaat tctattattg atgatttctt tatggatata	240
aacatgaata gaccattaaa cataactaaa tttaatccga atattcatga ctataactaat	300
aagcctgaaa atagagataa cttcgataaa ttagtcaaag aaacaagaga agcaatcgca	360
aacgctgacg aatcttgga aacaagaacc gtcaaaaat	399

<210> 57
 <211> 564
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 57

ES 2 806 945 T3

	tacggtgaat ctgaaacaaa atctcctggt gtaaaagaag agaagaaagt tgaagaacct	60
	caattacctt aagttggaaa ccagcaagag gataaaatta cagttggtac aactgaagaa	120
	gcaccattac caattgcgca accactagtt aaaattccac agggcacaat tcaaggtgaa	180
	attgtaaaag gtccggaata tctaacgatg gaaaataaaa cgttacaagg tgaaatcggt	240
	caaggtccag atttcccaac aatggaacaa aacagaccat ctttaagcga taattatact	300
	caaccgacga caccgaaccc tatttttaaaa ggtattgaag gaaactcaac taaacttgaa	360
	ataaaaccac aaggtactga atcaacgtta aaaggtactc aaggagaatc aagtgatatt	420
	gaagttaaac ctcaagcaac tgaaacaaca gaagcatcac attatccagc gagacctcaa	480
	tttaacaaaa cacctaagta tgtgaaatat agagatgctg gtacaggtat ccgtgaatac	540
	aacgatggaa catttgata tgaa	564
5	<210> 58 <211> 342 <212> ADN <213> <i>Staphylococcus aureus</i>	
	<400> 58	
	gcgagaccaa gattcaacaa gccaaagcgaa acaaatgcat acaacgtaac gacaaatcaa	60
	gatggcacag tatcatatgg cgctcgcccg acacaaaaca agccaagcga aacaaacgca	120
	tataacgtaa caacacatgc aaacggccaa gtatcatatc gagctcggtc gacacaaaac	180
	aagccaagcg aaacgaacgc atataacgta acaacacatg caaacgggtca agtgtcatac	240
	ggagctcgcc caacacaaaa caagccaagt aaaacaaatg catacaatgt aacaacacat	300
10	gcagatggta ctgcgacata tggctcctaga gtaacaaaat aa	342
15	<210> 59 <211> 447 <212> ADN <213> <i>Staphylococcus aureus</i>	
	<400> 59	
	atagtaacaa aggattatag tgggaaatca caagttaatg ctgggagtaa aaatgggaaa	60
	caaattgcag atggatatta ttggggaata attgaaaatc tagagaacca gttttacaat	120
	atttttcatt tattggatca gcataaatat gcagaaaaag aatataaaga tgcattagat	180
	aaattaaaaa ctagagtttt agaggaagac caatacctgc tagaaagaaa aaaagaaaaa	240
	tacgaaatth ataaagaact atataaaaaa taaaaaaaag agaatacctaa tactcaggtt	300
	aaaatgaaag catttgataa atacgatctt ggcgatttaa ctatggaaga atacaatgac	360
20	ttatcaaaat tattaacaaa agcattggat aactttaagt tagaagtaaa gaaaattgaa	420
	tcagagaatc cagatttaag accatat	447
	<210> 60	

ES 2 806 945 T3

<211> 390
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

5 <400> 60

tctgaaagtg aagagagaac agcatatggt aaaatagatt cacttggtga tcaagcatat	60
agtgtatatt ttgcctacgt tacagatgct caacataaaa cagaagcatt aaatcttagg	120
gcaaaaatag atttgatttt aggtgatgaa aaagatccaa ttagagtgac gaatcaacgt	180
actgaaaaag aaatgattaa agatttagaa tctattattg atgatttctt cattgaaaca	240
aagttgaata gacctcaaca cttactaga tatgatggaa ctaaacaatga ttaccataaa	300
cataaagatg gatttgatgc tttagttaaa gaaacaagag aagcggtttc taaggctgac	360
gaatcttgga aaactaaaac tgtcaaaaaa	390

<210> 61
<211> 597
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

10 <400> 61

15

tacggggaaa ctgaaacaaa atatcctggt gtaaaagaag agaagaaagt tgaagaacct	60
caatcaccta aagtttctga aaaagtggat gttcaggaaa cggttggtac aactgaagaa	120
gcaccattac caattgcgca accactagtt aaattaccac aaattgggac tcaaggcgaa	180
attgtaaaag gtcccgacta tccaactatg gaaaataaaa cggtacaagg tgtaattggt	240
caagggtccag atttcccaac aatggaacaa aacagaccat ctttaagtga caattataca	300
caaccatctg tgactttacc gtcaattaca ggtgaaagta caccaacgaa ccctatttta	360
aaaggatttg aaggaaactc atctaaactt gaaataaaac cacaaggtag tgaatcaacg	420
ttgaaaggta ttcaaggaga atcaagtgat attgaagtta aacctcaagc aactgaaaca	480
acagaagcat cacattatcc agcgagaccg caatttaaca aaacacctaa atatgtgaaa	540
tatagagatg ctggtacagg tattcgtgaa tacaacgatg gaacttttgg atatgaa	597

<210> 62
<211> 504
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

20 <400> 62

ES 2 806 945 T3

gcgagaccaa gattcaacaa gccatcagaa acaaacgcat acaacgtaac gacaaatcaa 60
gatggcacag tatcatatgg ggctcgccca acacaaaaca agccaagcaa aacaaatgca 120
tataacgtaa caacacatgc aaacggccaa gtatcatatg gcgctcgccc gacatacaac 180
aagccaagtg aaacaaatgc atacaacgta acgacaaatc gagatggcac agtatcatat 240
ggcgctcgcc cgacacaaaa caagccaagc gaaacgaatg catataacgt aacaacacac 300
ggaaatggcc aagtatcata tggcgctcgt ccgacacaaa agaagccaag caaaacaaat 360
gcatataacg taacaacaca tgcaaacggc caagtatcat atggcgctcg tccgacatac 420
aacaagccaa gtaaaacaaa tgcatacaat gtaacaacac atgcagatgg tactgcgaca 480
tatggtccta gagtaacaaa ataa 504

<210> 63
<211> 546
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 63

gattgggcaa ttacatthttg gaggaattaa aaaattatga aaaagcaaat aatttcgcta 60
ggcgcattag cagttgcatc tagcttattt acatgggata acaaagcaga tgcgatagta 120
acaaaggatt atagtaaaga atcaagagtg aatgagaaaa gtaaaaaggg agctactgtt 180
tcagattatt actattggaa aataattgat agtttagagg cacaatttac tggagcaata 240
gacttattgg aagattataa atatggagat cctatctata aagaagcgaa agatagattg 300
atgacaagag tattaggaga agaccagtat ttattaaaga aaaagattga tgaatatgag 360
ctttataaaa agtgggtataa aagttcaa atagaacacta atatgcttac tttccataaa 420
tataatcttt acaatttaac aatgaatgaa tataacgata tttttaactc tttgaaagat 480
gcagtttatc aatttaataa agaagttaaa gaaatagagc ataaaaatgt tgacttgaag 540
cagttt 546

<210> 64
<211> 399
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 64

ES 2 806 945 T3

gataaagatg gagaagacaa ggcaactaaa gaagtttatg accttgtttc tgaaattgat 60
acattagttg taacttatta tgctgataag gattatgggg agcatgcgaa agagttacga 120
gcaaaactgg acttaatcct tggagataca gacaatccac ataaaattac aaatgagcgt 180
ataaaaaaag aaatgatcga tgacttaa atcaattatag atgatttctt tatggagact 240
aaacaaaata gaccgaattc tataacaaaa tatgatccaa caaacacaa ttttaaagag 300
aagagtga aaacaccta ttttgataaa ttagttgaag aaacaaaaaa agcagttaaa 360
gaagcagacg aatcttgga aaataaaact gtcaaaaaa 399

<210> 65
<211> 471
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 65

tacgaggaaa ctgtaacaaa atctcctgtt gtaaaagaag agaagaaagt tgaagaacct 60
caattaccta aagttgga aaagcaagag gttaaaacta cggctggtaa agctgaagaa 120
acaacacaac cagtggcaca gccattagta aaaattccac aagaacaat ctatggtgaa 180
actgtaaaag gtccagaata tccaacgatg gaaaataaaa cgttacaagg tgaaatcggt 240
caaggtcccg attttctaac aatggaacaa aacagaccat ctttaagcga taattatact 300
caaccgacga caccgaaccc tattttagaa ggtcttgaag gtagctcatc taaacttgaa 360
ataaaaccac aaggtactga atcaacgttg aaaggtattc aaggagaatc aagtgatatt 420
gaagttaa acctcaagcaac tgaaacaaca gaagcttctc aatatggtcc g 471

<210> 66
<211> 597
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 66

ES 2 806 945 T3

agaccgcaat ttaacaaaac acctaagtat gtgaaatata gagatgctgg tacaggatc 60
cgtgaatata acgatggaac atttgatat gaagcgagac caagattcaa caagccaagt 120
gaaacaaatg catacaacgt aacgacaaat caagatggca cagtatcata cggagctcgc 180
ccaacacaaa acaagccaag tgaaacaaac gcatataacg taacaacaca tgcaaagtgt 240
caagtatcat acggtgctcg cccaacacaa aaaaagccaa gcaaaacaaa tgcatacaac 300
gtaacaacac atgcaaagtgg tcaagtatca tatggcgctc gcccgacaca aaaaagcca 360
agcaaaacaa atgcatataa cgtaacaaca catgcaaagt gtcaagtatc atacggagct 420
cgcccgacat acaagaagcc aagcgaaaca aatgcatata acgtaacaac acatgcaaagt 480
ggtcaagtat catatggcgc tcgcccgcgc caaaaaaagc caagcgaaac aaacgcatat 540
aacgtaacaa cacatgcaga tgggtactgcg acatatgggc ctagagtaac aaaataa 597

<210> 67
<211> 447
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 67

atagtaacta aagattatag taaagaatca agagtgaatg agaacagtaa atacgatata 60
ccaattccag attggtatct aggtagtatt ttaaacagat taggggatca aatatactac 120
gctaaggaat taactaataa atacgaatat ggtgagaaag agtataagca agcgatagat 180
aaattgatga ctagagtttt gggagaagat cattatctat tagaaaaaaa gaaagcacia 240
tatgaagcat acaaaaaatg gtttgaaaaa cataaaagtg aaatccaca ttctagttta 300
aaaaagatta aatttgacga ttttgattta tatagattaa cgaagaaaga atacaatgag 360
ttacatcaat cattaaaaga agctgttgat gagtttaata gtgaagtga aaatattcaa 420
tctaaacaaa aggatttatt accttat 447

<210> 68
<211> 399
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 68

ES 2 806 945 T3

gatgaagcaa ctgaaaatcg agtaacaaat ggaatatatg attttggttg cgagattgac	60
acattatacg cagcatattt taatcatagc caatatgggc ataatgctaa agaattaaga	120
gcaaagctag atataattct tggatgatgct aaagatcctg ttagaattac gaatgaaaga	180
ataagaaaag aaatgatgga tgattttaa tctattattg atgatttctt tatggataca	240
aacatgaata gaccattaaa cataactaaa tttaatccga atattcatga ctataactaat	300
aagcctgaaa atagagataa cttcgataaa ttagtcaaag aaacaagaga agcagtcgca	360
aacgctgacg aatcttgga aacaagaacc gtcaaaaat	399

<210> 69
 <211> 564
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 69

tacggatgaat ctgaaacaaa atctcctggt gtaaaagaag agaagaaagt tgaagaacct	60
caattaccta aagttggaaa ccagcaagag gataaaatta cagttggtac aactgaagaa	120
gcaccattac caattgcgca accactagtt aaaattccac agggcacaat tcaaggtgaa	180
attgtaaaag gtccggaata tctaacgatg gaaaataaaa cggtacaagg tgaaatcggt	240
caaggtccag atttcccaac aatggaacaa aacagaccat ctttaagcga taattatact	300
caaccgacga caccgaaccc tatttttaaaa ggtattgaag gaaactcaac taaacttgaa	360
ataaaaccac aaggtactga atcaacgtta aaaggtactc aaggagaatc aagtgatatt	420
gaagttaaac ctcaagcaac tgaaacaaca gaagcatcac attatccagc gagacctcaa	480
tttaacaaaa cacctaagta tgtgaaatat agagatgctg gtacaggtat ccgtgaatac	540
aacgatggaa catttgata tgaa	564

<210> 70
 <211> 504
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 70

ES 2 806 945 T3

gcgagaccaa gattcaacaa gccaaagcgaa acaaatgcat acaacgtaac gacaaatcaa 60
gatggcacag tatcatatgg cgctcgcccg acacaaaaca aaccaagcga aacaaatgca 120
tacaacgtaa caacacatgc aaacggccaa gtatcatatg gcgcccgcgc aacatacaag 180
aagccaagcg aaacaaacgc atacaacgta acgacaaatc aagatggcac agtatcatat 240
ggcgctcgcc cgacacaaaa caagccaagc gaaacaaacg catataacgt aacaacacat 300
gcaaacggcc aagtatcata cggagctcgt ccgacacaaa acaagccaag cgaaacgaac 360
gcatataacg taacaacaca tgcaaacggc caagtgtcat acggagctcg cccaacacaa 420
aacaagccaa gtaaaacaaa tgcatacaat gtaacaacac atgcagatgg tactgcgaca 480
tatggtccta gagtaacaaa ataa 504

<210> 71
<211> 525
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 71

atgaaaaagc aaataatttc gctagggcgca ttagcagttg catctagctt atttacetgg 60
gataacaaag cagatgcatg agtaacaaag gattatagtg ggaaatcaca agttaatgct 120
gggagtaaaa atgggacatt aatagatagc agatatttaa attcagctct atattatttg 180
gaagactata taatttatgc tataggatta actaataaat atgaatatgg agataatatt 240
tataaagaag ctaaagatag gttgttgga aaggtattaa gggaagatca atatcttttg 300
gagagaaaga aatctcaata tgaagattat aaacaatggc atgcaaatta taaaaaagaa 360
aatcctcgta cagattttaa aatggctaatt ttccataaat ataatttaga agaactttcg 420
atgaaagaat acaatgaact acaggatgca ttaaagagag cactggatga ttttcacaga 480
gaagttaaag atattaagga taagaattca gacttgaaaa ctttt 525

<210> 72
<211> 399
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 72

ES 2 806 945 T3

aatgcagcag aagaagataa agcaactaag gaagtatacg atctcgtatc tgaaattgat 60
acattagttg tatcatatta tggatgataag gattatgggg agcacgcgaa agagttacga 120
gcaaaactgg acttaatcct tggagatata gacaatccac ataaaattac aaatgaacgt 180
attaaaaaag aaatgattga tgacttaaat tcaattattg atgatttctt tatggaaact 240
aaacaaaata gaccgaaatc tataacgaaa tataatccta caacacataa ctataaaaca 300
aatagtata ataaaccta ttttgataaa ttagttgaag aaacgaaaaa agcagttaaa 360
gaagcagatg attcttggaa aaagaaaact gtcaaaaaa 399

<210> 73
<211> 471
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 73

tacggagaaa ctgaaacaaa atcgccagta gtaaaagaag agaagaaagt tgaagaacct 60
caagcaccta aagttgataa ccaacaagag gttaaaacta cggctggtaa agctgaagaa 120
acaacacaac cagttgcaca accattagtt aaaattccac agggcacaaat tacaggtgaa 180
attgtaaaag gtccggaata tccaacgatg gaaaataaaa cgggtacaagg tgaaatcgtt 240
caaggtcccg attttctaac aatggaacaa agcggcccat cattaagcaa taattataca 300
aaccacacgt taacgaaccc tatttttagaa ggtcttgaag gtagctcatc taaacttgaa 360
ataaaaccac aaggtactga atcaacgtta aaaggtactc aaggagaatc aagtgatatt 420
gaagttaaac ctcaagcaac tgaaacaaca gaagcttctc aatatgggtcc g 471

<210> 74
<211> 516
<212> ADN
<213> *Staphylococcus aureus*
<400> 74

agaccgcaat ttaacaaaac acctaaatat gttaaataa gagatgctgg tacaggtatc 60
cgtgaatata acgatggaac atttggatat gaagcgagac caagattcaa taagccatca 120
gaaacaaatg catataacgt aacaacacat gcaaatgggtc aagtatcata cggagctcgt 180
ccgacatata agaagccaag cgaaacgaat gcatacaatg taacaacaca tgcaaacggc 240
caagtatcat acggagctcg tccgacacaa aacaagccaa gcaaaacaaa cgcataatac 300
gtaacaacac atggaaacgg ccaagtatca tatggcgctc gcccaacaca aaacaagcca 360
agcaaaacaa atgcatacaa cgtaacaaca catgcaaacg gtcaagtgtc atacggagct 420
cgcccgacat acaagaagcc aagtaaaaca aatgcataca atgtaacaac acatgcagat 480
ggtactgcga catatggggc tagagtaaca aaataa 516

ES 2 806 945 T3

<210> 75

<211> 508

<212> PRT

5 <213> *Staphylococcus aureus*

<400> 75

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

Gln	Ile	Trp	Glu	Ser	Asn	Arg	Ala	Ser	Ala	Val	Val	Ser	Gly	Glu	Lys
			20					25					30		

10

ES 2 806 945 T3

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

ES 2 806 945 T3

275		280		285
Gln Asn His Lys Pro Ala Ser	Gln Glu Val Ser	Glu Gln Gln Lys Ala		
290	295	300		
Glu Tyr Asp Lys Arg Ala Glu Glu Arg Lys	Ala Arg Phe Leu Asp Asn			
305	310	315	320	
Gln Lys Ile Lys Lys Thr Pro Val Val	Ser Leu Glu Tyr Asp Phe Glu			
	325	330	335	
His Lys Gln Arg Ile Asp Asn Glu Asn Asp Lys Lys Leu Val Val Ser				
	340	345	350	
Ala Pro Thr Lys Lys Pro Thr Ser Pro Thr Thr Tyr Thr Glu Thr Thr				
	355	360	365	
Thr Gln Val Pro Met Pro Thr Val Glu Arg Gln Thr Gln Gln Gln Ile				
	370	375	380	
Ile Tyr Asn Ala Pro Lys Gln Leu Ala Gly Leu Asn Gly Glu Ser His				
385	390	395	400	
Asp Phe Thr Thr Thr His Gln Ser Pro Thr Thr Ser Asn His Thr His				
	405	410	415	
Asn Asn Val Val Glu Phe Glu Glu Thr Ser Ala Leu Pro Gly Arg Lys				
	420	425	430	
Ser Gly Ser Leu Val Gly Ile Ser Gln Ile Asp Ser Ser His Leu Thr				
	435	440	445	
Glu Arg Glu Lys Arg Val Ile Lys Arg Glu His Val Arg Glu Ala Gln				
	450	455	460	
Lys Leu Val Asp Asn Tyr Lys Asp Thr His Ser Tyr Lys Asp Arg Ile				
465	470	475	480	
Asn Ala Gln Gln Lys Val Asn Thr Leu Ser Glu Gly His Gln Lys Arg				
	485	490	495	
Phe Asn Lys Gln Ile Asn Lys Val Tyr Asn Gly Lys				
	500	505		

<210> 76
 <211> 1449
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*

<400> 76

gtgggtttctg gggagaagaa tccatatgta tctgagtcgt tgaaactgac taataataaa	60
aataaatcta gaacagtaga agagtataag aaaagcttgg atgatttaaat atggtccttt	120
ccaaacttag ataatgaaag atttgataat cctgaatata aagaagctat gaaaaaatat	180
caacagagat ttatggctga agatgaggct ttgaagaaat tttttagtga agagaaaaaa	240
ataaaaaatg gaaatactga taatttagat tatctaggat tatctcatga aagatatgaa	300
agtgtatttta atactttgaa aaaacaaagt gaggagtctt taaaagaaat tgaagatata	360
aaaaaagata accctgaatt gaaagacttt aatgaagagg agcaattaaa gtgcgactta	420
gaattaaaca aattagaaaa tcagatatta atgttaggta aaacatttta tcaaaactat	480
agagatgatg ttgaaagttt atatatgtaag ttagatttaa ttatgggata taaagatgaa	540
gaaagagcaa ataaaaaagc agttaacaaa aggatgtagt aaaataaaaa agaagactta	600
gaaaccataa ttgatgaatt ttttagtgat atagataaaa caagacctaa taatattcct	660
gttttagaag atgaaaaaca agaagagaaa aatcataaaa atatggctca attaaaatct	720
gacactgaag cagcaaaaag tgatgaatca aaaagaagca agagaagtaa aagaagttaa	780
aataactcaa atcacaaacc tgcactctca gaagtttctg aacaacaaaa agctgaatat	840
gataaaagag cagaagaaag aaaagcgaga tttttggata atcaaaaaat taagaaaaca	900
cctgtagtgt cattagaata tgattttgag cataaacaac gtattgacaa cgaaaacgac	960
aagaaacttg tggtttctgc accaacaag aaaccaacat caccgactac atatactgaa	1020
acaacgacac aggtaccaat gcctacagtt gagcgtcaaa ctcagcaaca aattatttat	1080
aatgcaccaa aacaattggc tggattaaat ggtgaaagtc atgatttcac aacaacgcat	1140
caatcaccaa caacttcaa tcacacgcat aataatgttg ttgaatttga agaaacgtct	1200
gctttacctg gtagaaaatc aggatcactg gttggtataa gtcaaattga ttcttctcat	1260
ctaactgaac gtgagaagcg tgtaattaag cgtgaacacg ttagagaagc tcaaaagtta	1320
gttgataatt ataaagatac acatagttat aaagaccgaa taaatgcaca acaaaaagta	1380
aatactttta gtgaaggtca tcaaaaacgt tttaataaac aaatcaataa agtatataat	1440
ggcaaataa	1449

5

<210> 77

<211> 1425

<212> ADN

<213> *Staphylococcus aureus*

10

<400> 77

gtggtttctg gggagaagaa tccatatgta tcaaaagctt tagaattgaa agataaaagt	60
aataaatcca attcttacga aaattataga gatagtttag aaagtttgat ttcatcatta	120
tcttttgctg attatgaaaa atatgaagag ccagaatatg aaaaggctgt aaaaaaatat	180
caacaaaaat ttatggctga agatgatgca ttaaaaaatt ttttaaatga agaaaagaag	240
ataaaaaatg cagatattag cagaaaatcg aataatttat taggtttaac acatgaaaga	300
tattcttata tttttgatac attaaagaaa aataaacaag agttttttaa agatattgaa	360
gaaatacaac tgaaaaatag tgatttaaag gactttaaca atacagagca acataatgcc	420
gacgtagaaa taaacaattt agaaaataaa gtattaatgg tagggatatac attctataat	480
acaaataagg acgaagttga agaattatat agtgagtttag atttgattgt tggagaagtt	540
caagataagt cggataaaaa aagagcagta aatcaaagga tgtaaataag aaaaaaagag	600
gatttagaat ttattataga taaatttttt aaaaaaattc aacaagaacg tccagagagt	660
ataccagcat taactagtga aaaaaatcat aatcagacta tggcattaaa gttaaaagca	720
gatacagaag ctgctaaaaa tgacgtatca aaaagaagta aaagaagttt aaataactcaa	780
aataataaat ctacaacaca agaaatttct gaagaacaaa aagctgaata tcaaagaaag	840
tcagagggcat taaaagaaag atttataaac agacaaaaat ctaaaaatga gtctgtgggt	900
tcactaatcg atgacgaaga cgacaacgaa aacgacaggc aacttggtgt ttctgcgcca	960
tcaaagaaac caacaacacc gactacatat actgaaacaa cgactcaggt accaatgcct	1020
acagttgagc gtcaaactca gcaacaaatc gtttacaaaa caccaaaacc attagctgga	1080
ttaaatggtg aaagtcataa tttcacaaca acgcatcaat caccaacaac ttcaaactcat	1140
acgcataata atgttggtga atttgaagaa acgtctgctt tacctggtag aaaatcagga	1200
tcactgggtg gtataagtca aattgattct tctcatctaa ctgaacgtga gaagcgtgta	1260
atcaagcgtg aacacgtag agaaagctcaa aagttagttg ataattataa agatacacat	1320
agttataaag accgattaaa tgcacaacaa aaagtaaata cttaagtga aggtcatcaa	1380
aaacgtttta ataaacaaat caataaagta tacaatggca aataa	1425

<210> 78

<211> 3694

<212> ADN

<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 78

ES 2 806 945 T3

gtggtttctg	gggaggagaa	tccatataaa	tctgagtcac	tgaaattaaa	tgggaaaaga	60
agtactacaa	taactagtga	taaatatgaa	gaaaatttag	atatgttaac	atcgtcatta	120
tcatttgcag	attatgaaaa	atatgaggaa	ccagaataca	aagaagcagt	taaaaagtat	180
caacaaaaat	ttatggctga	agatgatgca	ttaaaaaatt	ttttagtga	gagaaaaaaaa	240
taaaaaatag	aaataactaat	acatcaaatt	atctgggatt	aacacacgaa	agatatgagt	300
caatttataa	ttcattaaaa	aatcatcgtg	aagaattttc	aaaagaaatc	gaagaaatta	360

ataataaaaa	tccagtgtta	aaagaatata	acaatgagga	acaaactaaa	gctgatacgg	420
aattaaacac	tcttgaaaat	caagtactaa	tgatagggtta	tacattttat	cactcgaata	480
aaaatgaagt	agaagattta	tataacaaat	tagatatgat	tcttggttat	aaagatgaag	540
agagaaaaaa	gaagagggct	accaatcaaa	gaatgttcaa	taataaaaaa	gaggatttag	600
aaactattat	tgatgaattc	tttgagaaaa	ttggacaaca	aaggccaaca	tctataccaa	660
cattagcgcc	taaagaagaa	aaagaaacaa	atataaaaaa	tgcaaataaa	ttaaaatctg	720
acactgaagc	agcaaaaaat	gatgaagcaa	aaagaagttt	aaatacccac	aatcacaaat	780
ctgtatctca	agaagtctct	gaacaacaaa	aagctgacta	cgaaagaaaa	gctgaagaaa	840
gaaaagcgag	atttttagat	aagcaaaaaa	ataagaaaac	tcctgtagtt	tcattagaat	900
atgattttga	acataaacia	cgtgttgaca	acgaaaacga	caagcaactt	gtggtttctg	960
agccatcaaa	gaaaccaaca	acaccgccta	catacactga	aacaaccaca	cagctaccaa	1020
tgcttacagt	tgagcgtcaa	acacagcaac	aaatcgttta	caaagcacca	aaaccattag	1080
ctggattaaa	tggtgaaagt	catgatttca	caacaacgca	tcaatcacca	actacttcaa	1140
atcacacgca	taatcatctt	attgaaattg	aagaaacatc	tgctttacct	ggtagaaaga	1200
caggttcatt	ggttggtttg	agtcaaattg	attcttcgca	tttaactgaa	cgtgagaagc	1260
gcgtgattaa	acgtgaacac	gtgagagaag	ctcaaaagtt	agttgataat	tataaagata	1320
cacatagtta	taaagaccga	ttaaattgcc	aacaaaaagt	aaatacttta	agtcgaggtc	1380
atcaaaaacg	ttttaataaa	caaattaata	aagtatataa	tggaataaa	ttaatgcatg	1440
gctgcaaagg	aaataatgag	tttgccgtaa	aaataacaac	attttaaact	agcaataaat	1500
aatatcaaag	tcatcatttc	aatgatgcaa	tctagtatag	tccacattct	aaacaggtgt	1560
ggactattac	ttttttcact	ttatattacg	aaaaaattat	tatgcttaac	tatcaatatc	1620
aataattaat	tttaagctga	aaaacaataa	aaatgttaag	acaacgttta	cttcaagtta	1680
attattatac	tgaaaattct	ggtatataat	gctgttagtg	aatataacag	gaaaattaaa	1740
ttggttatga	tattgagtct	atataaagga	gaaataacag	atgaaaaaga	aattattagt	1800
tttaactatg	agcacgctat	ttgctacaca	atttatgaat	tcaaatcacg	ctaatgcac	1860
aacagaaaag	gttgataaaa	actttgtagt	tccagaatcg	ggtattaata	aaattattcc	1920
aacttacgat	gaatttaaaa	aagcaccaaa	agtaaagttt	agtaatttag	ctgacaacaa	1980
aaactttgta	gcttctgaag	ataaattgaa	taagattgca	gatccatcgg	cagctagtaa	2040
aattgtagat	aaaaactttg	ccgtaccaga	atcaaaaatta	ggaatcattg	taccagagta	2100
taaagaaatc	aataatcgag	tgaatgtaac	aacaaacaat	ccagcttcaa	aacaagttga	2160
caagcaaatt	gttgctaaag	accagaggtg	gaatagattt	attacgcaaa	ataaagtaaa	2220
ccatcgtttc	attactacgc	aaaccacta	taagaaagtt	attacttcat	acaaatcaac	2280

acatgtacat aaacatgtaa accatgcaac atcttctatc catcatcact ttactattaa	2340
accatcagaa gcacctagat atacacaccc atctcaatct caatcggttaa ttataaatca	2400
tcattttgca gttcctggat accatgggtca taaagttgta acaccaggac aagctagtat	2460
tagaattcat cacttttgtg ctgtacctca aataaatagt tttaagggtca ttccatcata	2520
tggtcacaat tcacatcgta tgcattgtacc aagtttccaa aataacacaa cagcaacaca	2580
tcaaaatgca aaagtaaata aaacttataa ctataaatat ttttatactt ataaagtagt	2640
caaagggtgta aaaaaacatt tctcattttc aaaatcacat gggttgtaaaa ttgttaaacc	2700
agcattaaac atcaaaaatg taaattatca atatgctggt ccaagtaata gccctacaca	2760
cggtgttcct gagtttcagg gtatcttacc agcaccacga gtataaaaat tgacattaag	2820
tttacgagat atgataaata cctattatct taaacatagt ctgcaatcta tgagggtgta	2880
ggctatgttt tttgcagttt atcaataaac acccatcaac aaattatacc gtttttctac	2940
tttaaaagtt ggaagtaaca taatcttaaa taaatatatt attaattaag ataaatataa	3000
gactcgagat tattgttaat agtttgttca tcgcaagtta attattgttt ctaaaaatatt	3060
ggtatataat tttcaatggc gaagaaaaca gggtaaaaaa gtcgggttttt aaatcaaagc	3120
aaataaggag taaaaaatga aaaggaaagt actagtatta acaatgggag tactttgtgc	3180
gacacaatta tggcaaacga ataattgcaa agcttttagtg acagagagtg gcgttaatga	3240
tactaagcaa ttactgaag taacatcgga agaaaaagtt ataaaagatg ctatttcgaa	3300
agtcaatgaa agctttatct actatcccca aaatgatttg aagggttag gtggagaaca	3360
caacgattac gaaaaaatta catatagcac ttcttctaata atgttttag aattatcaat	3420
gagttcaaaa tacgtaggcg gtaaatcagg agctatgggt gggttatagtg aaatttactc	3480
atcacatttc acagaccgag acaaacgtgc tatcagacgt gatcatgtta aagaagcaca	3540
aaacttgatt aatgattata aatatacgca aatatatgaa gactttgcta aagctactgc	3600
aaaggtaagt acacttagtc agtctcacca aaattattta aataaacaaa ttgataaagt	3660
gaataataag atagagaaaa ctgaaaaacg ctaa	3694

<210> 79

<211> 399

<212> ADN

<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 79

ES 2 806 945 T3

```

gtggtttctg gggagaagaa tccatatgta tctgagtcgt tgaaactgac taataataaa      60
aataaatcta gaacagtaga agagtataag aaaagcttgg atgatttaat atggtccttt      120
ccaaacttag ataatgaaag atttgataat cctgaatata aagaagctat gaaaaaatat      180
caacagagat ttatggctga agatgaggct ttgaagaaat tttttagtga agagaaaaaa      240
ataaaaaatg gaaatactga taatttagat tatctaggat tatctcatga aagatatgaa      300
agtgtattta atactttgaa aaaacaaagt gaggagttct taaaagaaat tgaagatata      360
aaaaaagata accctgaatt gaaagacttt aatgaatag                                399

```

<210> 80

<211> 320

<212> PRT

<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 80

5

ES 2 806 945 T3

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

Leu Glu Asn Lys Lys Glu Asp Leu Glu Thr Ile Ile Asp Glu Phe Phe
195 200 205

Ser Asp Ile Asp Lys Thr Arg Pro Asn Asn Ile Pro Val Leu Glu Asp
210 215 220

Glu Lys Gln Glu Glu Lys Asn His Lys Asn Met Ala Gln Leu Lys Ser
225 230 235 240

Asp Thr Glu Ala Ala Lys Ser Asp Glu Ser Lys Arg Ser Lys Arg Ser
245 250 255

Lys Arg Ser Leu Asn Thr Gln Asn His Lys Pro Ala Ser Gln Glu Val
260 265 270

Ser Glu Gln Gln Lys Ala Glu Tyr Asp Lys Arg Ala Glu Glu Arg Lys
275 280 285

Ala Arg Phe Leu Asp Asn Gln Lys Ile Lys Lys Thr Pro Val Val Ser
290 295 300

Leu Glu Tyr Asp Phe Glu His Lys Gln Arg Ile Asp Asn Glu Asn Asp
305 310 315 320

<210> 81
<211> 162
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 81

Lys Lys Leu Val Val Ser Ala Pro Thr Lys Lys Pro Thr Ser Pro Thr
1 5 10 15

Thr Tyr Thr Glu Thr Thr Thr Gln Val Pro Met Pro Thr Val Glu Arg
20 25 30

Gln Thr Gln Gln Gln Ile Ile Tyr Asn Ala Pro Lys Gln Leu Ala Gly
35 40 45

Leu Asn Gly Glu Ser His Asp Phe Thr Thr Thr His Gln Ser Pro Thr
50 55 60

Thr Ser Asn His Thr His Asn Asn Val Val Glu Phe Glu Glu Thr Ser
65 70 75 80

Ala Leu Pro Gly Arg Lys Ser Gly Ser Leu Val Gly Ile Ser Gln Ile
85 90 95

ES 2 806 945 T3

Asp Ser Ser His Leu Thr Glu Arg Glu Lys Arg Val Ile Lys Arg Glu
100 105 110

His Val Arg Glu Ala Gln Lys Leu Val Asp Asn Tyr Lys Asp Thr His
115 120 125

Ser Tyr Lys Asp Arg Ile Asn Ala Gln Gln Lys Val Asn Thr Leu Ser
130 135 140

Glu Gly His Gln Lys Arg Phe Asn Lys Gln Ile Asn Lys Val Tyr Asn
145 150 155 160

Gly Lys

<210> 82

<211> 320

<212> PRT

<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 82

Val Val Ser Gly Glu Lys Asn Pro Tyr Val Ser Lys Ala Leu Glu Leu
1 5 10 15

Lys Asp Lys Ser Asn Lys Ser Asn Ser Tyr Glu Asn Tyr Arg Asp Ser
20 25 30

Leu Glu Ser Leu Ile Ser Ser Leu Ser Phe Ala Asp Tyr Glu Lys Tyr
35 40 45

Glu Glu Pro Glu Tyr Glu Lys Ala Val Lys Lys Tyr Gln Gln Lys Phe
50 55 60

Met Ala Glu Asp Asp Ala Leu Lys Asn Phe Leu Asn Glu Glu Lys Lys
65 70 75 80

Ile Lys Asn Ala Asp Ile Ser Arg Lys Ser Asn Asn Leu Leu Gly Leu
85 90 95

Thr His Glu Arg Tyr Ser Tyr Ile Phe Asp Thr Leu Lys Lys Asn Lys
100 105 110

Gln Glu Phe Leu Lys Asp Ile Glu Glu Ile Gln Leu Lys Asn Ser Asp
115 120 125

Leu Lys Asp Phe Asn Asn Thr Glu Gln His Asn Ala Asp Val Glu Ile
130 135 140

ES 2 806 945 T3

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

<210> 83
 <211> 154
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 83

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

ES 2 806 945 T3

```

Thr Thr Thr His Gln Ser Pro Thr Thr Ser Asn His Thr His Asn Asn
 50                      55                      60

Val Val Glu Phe Glu Glu Thr Ser Ala Leu Pro Gly Arg Lys Ser Gly
65                      70                      75                      80

Ser Leu Val Gly Ile Ser Gln Ile Asp Ser Ser His Leu Thr Glu Arg
                      85                      90                      95

Glu Lys Arg Val Ile Lys Arg Glu His Val Arg Glu Ala Gln Lys Leu
                      100                     105                     110

Val Asp Asn Tyr Lys Asp Thr His Ser Tyr Lys Asp Arg Leu Asn Ala
                      115                     120                     125

Gln Gln Lys Val Asn Thr Leu Ser Glu Gly His Gln Lys Arg Phe Asn
130                     135                     140

Lys Gln Ile Asn Lys Val Tyr Asn Gly Lys
145                     150

```

<210> 84
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 84

```

Val Val Ser Gly Glu Glu Asn Pro Tyr Lys Ser Glu Ser Leu Lys Leu
 1                      5                      10                      15

Asn Gly Lys Arg Ser Thr Thr Ile Thr Ser Asp Lys Tyr Glu Glu Asn
                20                      25                      30

Leu Asp Met Leu Ile Ser Ser Leu Ser Phe Ala Asp Tyr Glu Lys Tyr
                35                      40                      45

Glu Glu Pro Glu Tyr Lys Glu Ala Val Lys Lys Tyr Gln Gln Lys Phe
50                      55                      60

Met Ala Glu Asp Asp Ala Leu Lys Asn Phe Leu Val Lys Arg Lys Lys
65                      70                      75                      80

```

<210> 85
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 85

ES 2 806 945 T3

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

1 5 10 15

Thr Asn Asn Lys Asn Lys Ser Arg Thr Val Glu Glu Tyr Lys Lys Ser
20 25 30

Leu Asp Asp Leu Ile Trp Ser Phe Pro Asn Leu Asp Asn Glu Arg Phe
35 40 45

Asp Asn Pro Glu Tyr Lys Glu Ala Met Lys Lys Tyr Gln Gln Arg Phe
50 55 60

Met Ala Glu Asp Glu Ala Leu Lys Lys Phe Phe Ser Glu Glu Lys Lys
65 70 75 80

Ile Lys Asn Gly Asn Thr Asp Asn Leu Asp Tyr Leu Gly Leu Ser His
85 90 95

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

Phe Leu Lys Glu Ile Glu Asp Ile Lys Lys Asp Asn Pro Glu Leu Lys
115 120 125

Asp Phe Asn Glu
130

<210> 86

<211> 320

<212> PRT

<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 86

ES 2 806 945 T3

Val Val Ser Gly Glu Lys Asn Pro Tyr Val Ser Glu Ser Leu Lys Leu
1 5 10 15

Thr Asn Asn Lys Asn Lys Ser Arg Thr Val Glu Glu Tyr Lys Lys Ser
20 25 30

Leu Asp Asp Leu Ile Trp Ser Phe Pro Asn Leu Asp Asn Glu Arg Phe
35 40 45

Asp Asn Pro Glu Tyr Lys Glu Ala Met Lys Lys Tyr Gln Gln Arg Phe
50 55 60

Met Ala Glu Asp Glu Ala Leu Lys Lys Phe Phe Ser Glu Glu Lys Lys
65 70 75 80

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

ES 2 806 945 T3

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

<210> 87
<211> 162
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

ES 2 806 945 T3

<400> 87

Lys Lys Leu Val Val Ser Ala Pro Thr Lys Lys Pro Thr Ser Pro Thr
1 5 10 15

Thr Tyr Thr Glu Thr Thr Thr Gln Val Pro Met Pro Thr Val Glu Arg
20 25 30

Gln Thr Gln Gln Gln Ile Ile Tyr Asn Ala Pro Lys Gln Leu Ala Gly
35 40 45

Leu Asn Gly Glu Ser His Asp Phe Thr Thr Thr His Gln Ser Pro Thr
50 55 60

Thr Ser Asn His Thr His Asn Asn Val Val Glu Phe Glu Glu Thr Ser
65 70 75 80

Ala Leu Pro Gly Arg Lys Ser Gly Ser Leu Val Gly Ile Ser Gln Ile
85 90 95

Asp Ser Ser His Leu Thr Glu Arg Glu Lys Arg Val Ile Lys Arg Glu
100 105 110

His Val Arg Glu Ala Gln Lys Leu Val Asp Asn Tyr Lys Asp Thr His
115 120 125

Ser Tyr Lys Asp Arg Ile Asn Ala Gln Gln Lys Val Asn Thr Leu Ser
130 135 140

Glu Gly His Gln Lys Arg Phe Asn Lys Gln Ile Asn Lys Val Tyr Asn
145 150 155 160

Gly Lys

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunógena que comprende al menos dos dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes, en donde cada uno de los al menos dos dominios 1-2 es al menos 80 % idéntico en secuencia a un dominio 1-2 de la SEQ ID NO: 33-41 y en donde al menos uno del dominio 1-2 está comprendido en una proteína de coagulasa de longitud inferior a la completa que carece de todo un dominio conector (dominio L), dominio de repetición (dominio R) o dominio de unión a fibrinógeno (dominio Fgb).
2. La composición de la reivindicación 1, en donde la proteína de coagulasa de longitud inferior a la completa, carece de todo el segmento de dominio conector (L) o repetido (R).
3. La composición de la reivindicación 1, en donde la proteína de coagulasa de longitud inferior a la completa, carece de todo el segmento de dominio conector (L) o de unión a fibrinógeno (Fgb).
4. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde uno de los dominios 1-2 es de una cepa de *S. aureus* Newman, 85/2082, MW2, MSSA476, N315, Mu50, MRSA252, Cowan I, WIS o USA300.
5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde uno de los dominios 1-2 es un dominio 1-2 de Coa al menos 80 % idéntico en secuencia a una SEQ ID NO identificada en las SEQ ID NO: 33-37 y 41.
6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde uno de los dominios 1-2 es un dominio 1-2 de la proteína de unión al factor de von Willebrand (vWbp) al menos 80 % idéntico en secuencia a una SEQ ID NO identificada en las SEQ ID NO: 38-40.
7. Una cantidad eficaz de una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en un método para tratar o prevenir una infección estafilocócica en un sujeto.
8. Una cantidad eficaz de una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en un método según la reivindicación 7, en donde el sujeto se trata en función de una prueba que indica infección estafilocócica.
9. Una cantidad eficaz de una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en un método según la reivindicación 7 u 8, en donde la composición o el polipéptido se administra por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía intravascular, por vía intratraqueal, por vía intratecal, por vía intraocular, por vía intraperitoneal, por vía tópica, por vía oral, mediante inyección, mediante infusión o mediante embolada.
10. Una cantidad eficaz de una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en un método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde dicho método comprende además administrar al sujeto uno o más antibióticos.
11. Una cantidad eficaz de una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en un método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en donde el sujeto es inmunodeficiente, está inmunodeprimido, está hospitalizado, se somete a un procedimiento médico invasivo, tiene una infección respiratoria, está infectado con el virus de la gripe o está usando un respirador.
12. Una cantidad eficaz de una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en un método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en donde el sujeto presenta un absceso cutáneo, un divieso o un forúnculo.
13. La composición inmunógena de la reivindicación 1, que comprende al menos seis dominios 1-2 de coagulasa estafilocócica diferentes, en donde la composición comprende al menos los dominios 1-2 de Coa estafilocócica de las cepas MRSA252, MW2, N315 y USA300 y los dominios 1-2 de la proteína de unión al factor de von Willebrand (vWbp) de *S. aureus* N315 y USA300.

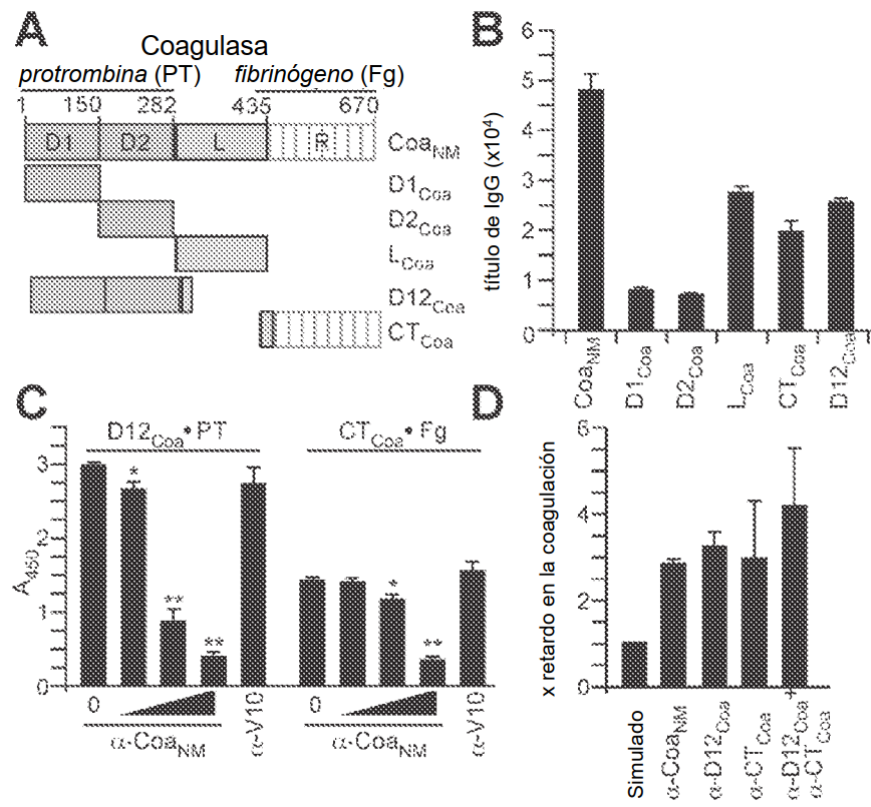


FIG. 1

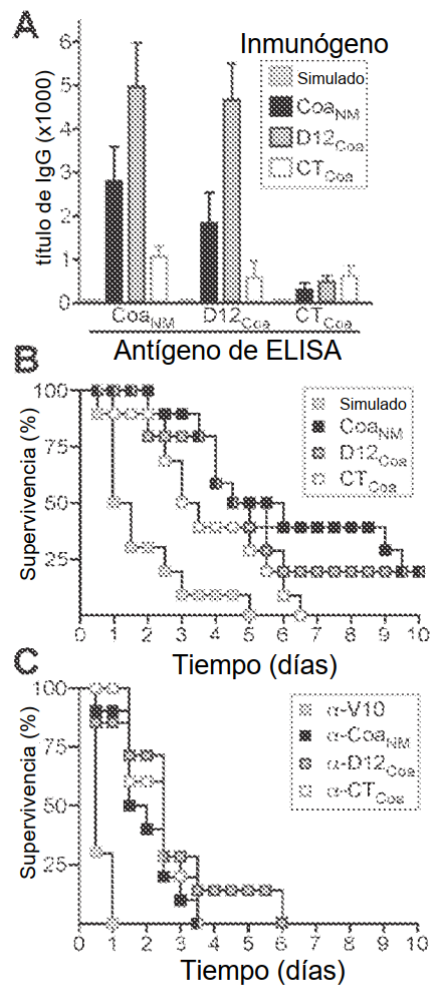


FIG. 2

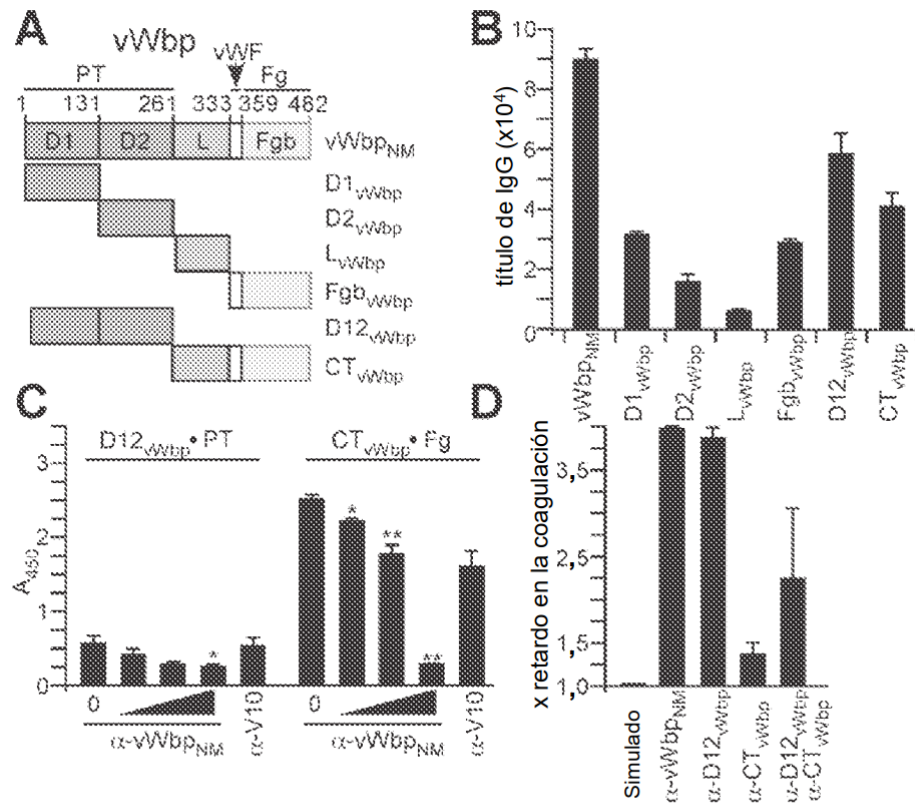


FIG. 3

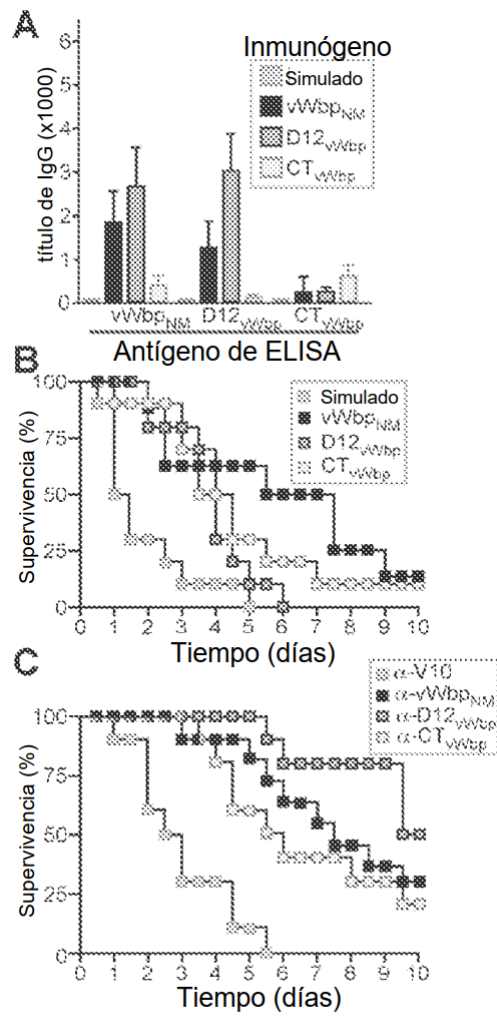


FIG. 4

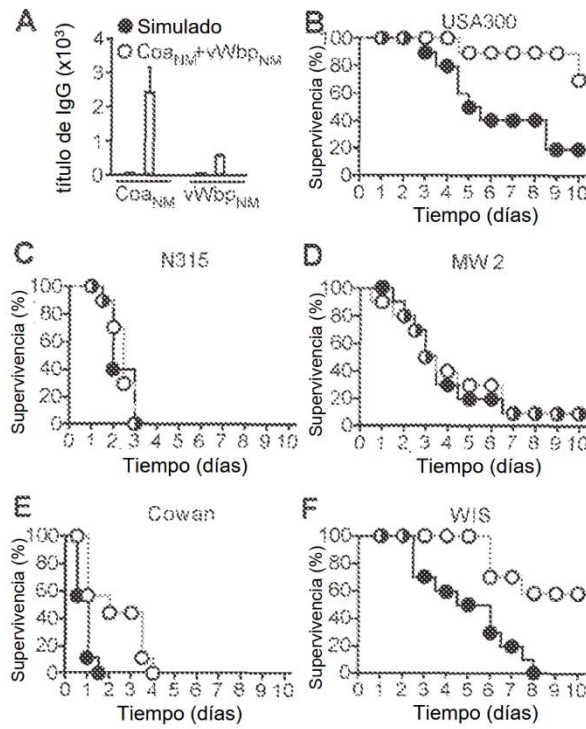


FIG. 5

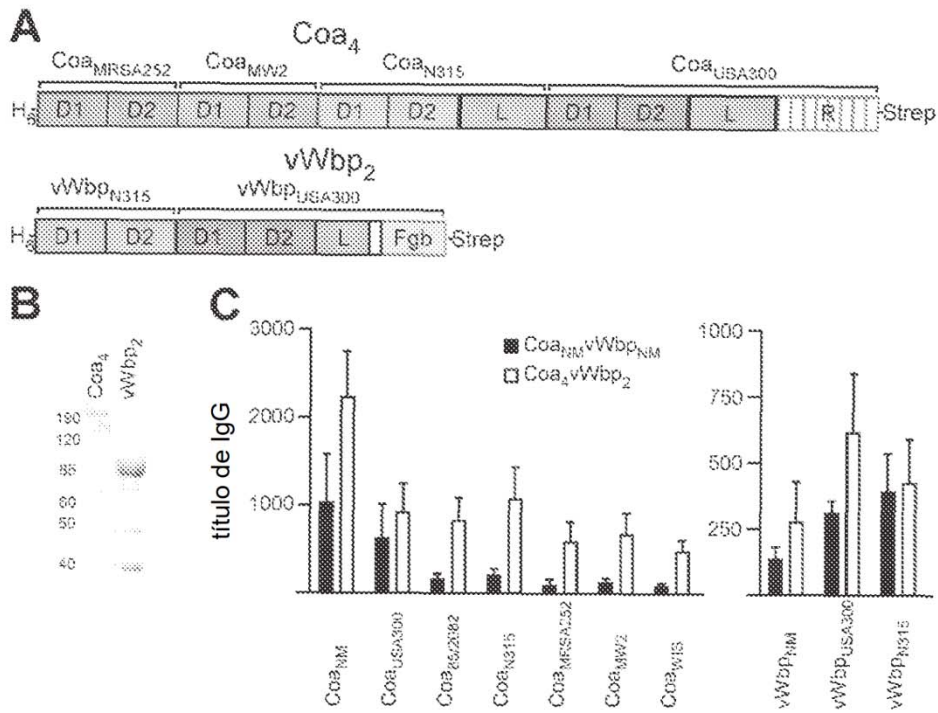


FIG. 6

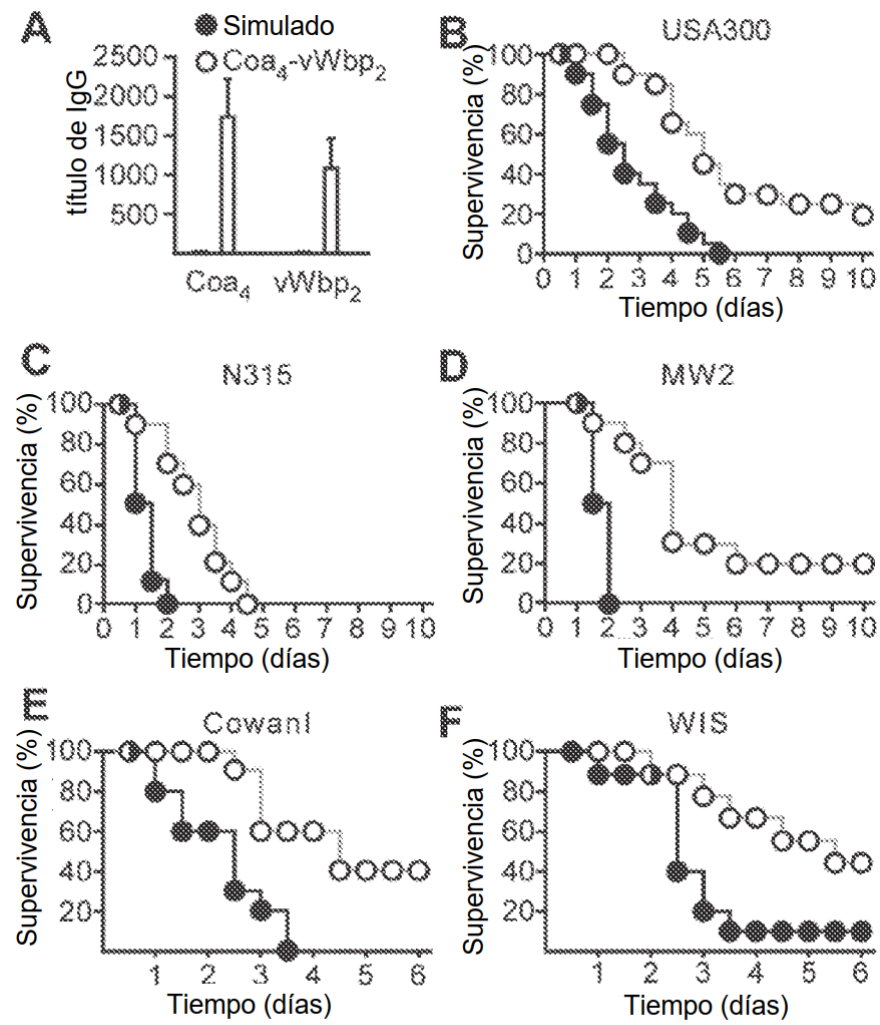


FIG. 7

Alineamiento de Coa de cinco cepas de *S. aureus*

USA300__Coa	ATGAAAAAGCAAATAATTTCCGCTAGGCGCATTAGCAGTTGCATCTAGCTTATTACATGG	60
N315__Coa	ATGAAAAAGCAAATAATTTCCGCTAGGCGCATTAGCAGTTGCATCTAGCTTATTACATGG	60
MRSA252__Coa	ATGAAAAAGCAAATAATTTCCGCTAGGCGCATTAGCAGTTGCATCTAGCTTATTACATGG	60
MW2__Coa	ATGAAAAAGCAAATAATTTCCGCTAGGCGCATTAGCAGTTGCATCTAGCTTATTACATGG	60
WIS__Coa	-----	
USA300__Coa	GATAACAAAGCAGATGCGATAGTAACAAAGGATTATAGTGGGAAATCACAAGTTAATGCT	120
N315__Coa	GATAACAAAGCAGATGCGATAGTAACAAAGGATTATAGTAAAGAAATCAAGAGTGAATGAG	120
MRSA252__Coa	GATAACAAAGCAGATGCGATAGTAACAAAGGATTATAGTAAAGAAATCAAGAGTGAATGAG	120
MW2__Coa	GATAACAAAGCAGATGCGATAGTAACAAAGGATTATAGTGGGAAATCACAAGTTAATGCT	120
WIS__Coa	-----ATAGTAACAAAGGATTATAGTGGGAAATCACAAGTTAATGCT	42
	***** * * ***** * * * * *	
USA300__Coa	GGGAGTAAAAATGGGAC-ATTAAT---AGATAGCAGATATTTAAATTCAGCTCTATATTA	176
N315__Coa	AAAAGTAAAAAGGGAGCTACTGTTTC-AGATTATTACTATTGGAAAATAAATT---GATAG	176
MRSA252__Coa	AACAGTAAATACGATAC-ACCAATTCCAGATTG---GTATCTAGGTAGTATTTTAAACAG	176
MW2__Coa	GGGAGTAAAAATGGGAA-ACAAATTGCAGATGGATATTATTGGGGAATAAATT---GAAAA	176
WIS__Coa	GGGAGTAAAAATGGGAA-ACAAATTGCAGATGGATATTATTGGGGAATAAATT---GAAAA	98
	***** * * * * * * * * * *	
USA300__Coa	TTTGGAAAGACTATATAATTTAT---GCTATAGGATTAACTAATAAATATGAATATGGAG	232
N315__Coa	TTTAGAGG---CACAAATTTACTGGAGCAATAGACTTATTGGAAAGATTATAAATATGGAG	232
MRSA252__Coa	ATTAGGGGATCAAAATATACTAC---GCTAAGGAATTAACTAATAAATACGAATATGGTG	232
MW2__Coa	TCTAGAAAACCA---GTTTTAC-AATATTTTTCATTTACTGGATCAGCATAAATATGCAG	232
WIS__Coa	TCTAGAGAACCA---GTTTTAC-AATATTTTTCATTTATTGGATCAGCATAAATATGCAG	154
	* * * * * * * * * * * * * * *	
USA300__Coa	ATAATATTTATAAAGAAGCTAAAGATAGGTTGTTGGAAAAGGTATTAGGGAAGATCAAT	292
N315__Coa	ATCCTATCTATAAAGAAGCGAAGATAGATTGATGACAAGAGTATTAGGAGAAGACCAGT	292
MRSA252__Coa	AGAAAGAGTATAAAGCAAGCGATAGATAAATTGATGACTAGAGTTTGGGAGAAGATCATT	292
MW2__Coa	AAAAAGAATATAAAGATGCAGTAGATAAATTAAGAACTAGAGTTTATAGGGAAGACCAT	292
WIS__Coa	AAAAAGAATATAAAGATGCATTAGATAAATTAAGAACTAGAGTTTATAGGGAAGACCAT	214
	* * * * * * * * * * * * * * *	
USA300__Coa	ATCTTTTGGAGAGAAAGAAATCTCAATATGAAGATTATAAACAATGGGTATGCAAAATTATA	352
N315__Coa	ATTTATTAAAGAAAAGATTGATGAATATGAGCTTTATAAAAAGTGGTATAAAAGTT-CA	351
MRSA252__Coa	ATCTATTAGAAAAAAGAAAGCACAAATATGAAGCATACAAAAATGGTTTGAAAAACATA	352
MW2__Coa	ACCTGCTAGAAAGAAAAAGAAAAATACGAAATTTATAAAGAACTATATAAAAAATACA	352
WIS__Coa	ACCTGCTAGAAAGAAAAAAGAAAAATACGAAATTTATAAAGAACTATATAAAAAATACA	274
	* * * * * * * * * * * * * * *	
USA300__Coa	AAAAAGAAATCCTCGTACAGATTTAAAAATGGCTAATTTTCATAAATATAATTTAGAAG	412
N315__Coa	AATAAGAACACT-----AATATGCTTACTTTCCATAAATATAATCTTTTACA	397
MRSA252__Coa	AAAGTGAAAATCCACATTCTAGTTTAAAAAAGATTAAATTTGACGATTTTGATTTATATA	412
MW2__Coa	AAAAAGAGAATCCTAATCTCAAGTTAAATGAAAGCATTGGATAAATACGATCTTGGCG	412
WIS__Coa	AAAAAGAGAATCCTAATCTCAGGTTAAATGAAAGCATTGGATAAATACGATCTTGGCG	334
	** * * * * * * * * * *	
USA300__Coa	AACCTTCGATGAAAGAATACAATGAACACAGGATGCATTAAAGAGAGCACTGGATGATT	472
N315__Coa	ATTTAACAAATGAATGAATATACGATATTTTAACTCTTTGAAAGATGCAGTTTATCAAT	457
MRSA252__Coa	GATTAACGAAGAAGAATACAATGAGTTACATCAATCATTAAGAAGAGCTGTTGATGAGT	472
MW2__Coa	ATTTAACTATGGAAGAATACAATGACTTATCAAAATTATTAAACAAAGCATTGGATAACT	472
WIS__Coa	ATTTAACTATGGAAGAATACAATGACTTATCAAAATTATTAAACAAAGCATTGGATAACT	394
	* * * * * * * * * * *	
USA300__Coa	TTACACAGAGAAGTTAAAGATATTAAGGATAAGAATTCAGACTTGAAAACTTTTAATGCAG	532
N315__Coa	TTAATAAAGAAGTTAAAGAAATAGAGCATAAAAATGTTGACTTGAAAGCAGTTTGATAAAG	517
MRSA252__Coa	TTAATAGTGAAAGTCAAAATATTCATCTAAACAAAAGGATTTATFACCTTATGATGAAG	532
MW2__Coa	TTAAGTTAGAAGTAAAGAAAAATTGAATCAGAGAATCCAGATTTAAACCATATCTGAAA	532
WIS__Coa	TTAAGTTAGAAGTAAAGAAAAATTGAATCAGAGAATCCAGATTTAAGACCATATCTGAAA	454
	** * * * * * * * * * *	
USA300__Coa	CAGAAGAAGATAAAGCAACTAAGGAAGTATACGATCTCGTATCTGAAATTGATACATTAG	592
N315__Coa	ATGGAGAAGACAAGGCAACTAAAGAAAGTTTATGACCTGTTTCTGAAATTGATACATTAG	577
MRSA252__Coa	CAACTGAAAATCGAGTAACAAATGGAAATATATGATTTTGGTTTGGGAGATTGACACATTAT	592
MW2__Coa	GCGAAGAAAACAGCATATGTTAAATAGATTCACTTGTGATCAAGCATATAGTGTAT	592
WIS__Coa	GTGAAGAGACACAGCATATGTTAAATAGATTCACTTGTGATCAAGCATATAGTGTAT	514
	** * * * * * * * * * *	
USA300__Coa	TTGTATCATATTATGGTGATAAGGATTATGGGGAGCACGCGAAAGAGTTACGAGCAAAAC	652

ES 2 806 945 T3

N315_Coa	TTGTAACCTTATTATGCTGATAAGGATTATGGGGAGCATGCGAAAGAGTTACGAGGCAAAAC	637
MRSA252_Coa	ACGCAGCATATTTTAATCATAGCCAAATATGGTCATAATGCTAAAGAATTAAGAGCAAAAGC	652
MW2_Coa	ATTTTGCTACGTTACAGATGCAACAATAAAACAGAAGCATTAAATCTTAGGGCGAAAA	652
WIS_Coa	ATTTTGCTACGTTACAGATGCTCAACATAAAACAGAAGCATTAAATCTTAGGGCGAAAA	574
	* * * * *	
USA300_Coa	TGGACTTAATCCTTGGAGATACAGACAATCCACATAAAATTACAAATGAACGTATTAAAA	712
N315_Coa	TGGACTTAATCCTTGGAGATACAGACAATCCACATAAAATTACAAATGAGCGTATAAAAA	697
MRSA252_Coa	TAGATATAAATCTTGGTGATGCTAAAGATCCTGTTAGAATTACGAATGAAAGAATAAGAA	712
MW2_Coa	TTGATTTGATTTTAGGTGATGAAAAAGATCCAAATTAGAGTTACGAATCAACGTACTGAAA	712
WIS_Coa	TAGATTTGATTTTAGGTGATGAAAAAGATCCAAATTAGAGTGACGAATCAACGTACTGAAA	634
	* * * * *	
USA300_Coa	AAGAAATGATTGATGACTTAAATTCATTTATGATGATTTCTTTATGAAAATAAACA-A	771
N315_Coa	AAGAAATGATCGATGACTTAAATTCATTTATGATGATTTCTTTATGGAAGATAAACA-A	756
MRSA252_Coa	AAGAAATGATCGATGATTTAAATTCATTTATGATGATTTCTTTATGGATAC-AAACATG	771
MW2_Coa	AAGAAATGATTAAAGATTTAGAATCTATTATTGATGATTTCTTCATTGAAACCAAGTT-G	771
WIS_Coa	AAGAAATGATTAAAGATTTAGAATCTATTATTGATGATTTCTTCATTGAAACCAAGTT-G	693
	* * * * *	
USA300_Coa	AATAGACCGAAATCTATAACGAAATATAATCCTACAACACATAACTATAAAACAAATAGT	831
N315_Coa	AATAGACCGAAATCTATAACGAAATATAATCCTACAACACATAACTATAAAACAAATAGT	816
MRSA252_Coa	AATAGACCATTAACATAACTAAATTTAATCCGAATATTCATGACTATACATAAAGCCT	831
MW2_Coa	AATAGACCTAAACACATTACTAGGTATGATGGAACATAACATGATTACCA-----T	822
WIS_Coa	AATAGACCTCAACACATTACTAGATATGATGGAACATAACATGATTACCA-----T	744
	* * * * *	
USA300_Coa	GATAATAAACCTAATTTTGATAAATTAGTTGAAGAAACGAAAAAGCAGTTAAAGAAGCA	891
N315_Coa	GAAATTAACCTAATTTTGATAAATTAGTTGAAGAAACGAAAAAGCAGTTAAAGAAGCA	876
MRSA252_Coa	GAAATAGAGATAAATTCGATAAATTAGTCAAGAAACAAAGAGAAGCAATCGCAACCGCT	891
MW2_Coa	AAACATAAAGATGGATTTGATGCTCTAGTTAAAGAAACAAAGAGAAGCGGTTGCAAGGCT	882
WIS_Coa	AAACATAAAGATGGATTTGATGCTTTAGTTAAAGAAACAAAGAGAAGCGGTTTCTAAGGCT	804
	* * * * *	
USA300_Coa	GATGATTTCTTGAAAAAGAAACTGTCAAAAAATACGGGAAACTGAACAAAAATCGCCA	951
N315_Coa	GACGAATCTTGAAAAATTAACCTGTCAAAAAATACGAGGAAACTGTAACAAAAATCTCCT	936
MRSA252_Coa	GACGAATCTTGAAAAACAAAGACCGCTCAAAATTAACGGTGAATCTGAACAAAAATCTCCT	951
MW2_Coa	GACGAATCTTGAAAAATTAACCTGTCAAAAAATACGAGGAAACTGTAACAAAAATCTCCA	942
WIS_Coa	GACGAATCTTGAAAAATTAACCTGTCAAAAAATACGGGAAACTGAACAAAAATCTCCT	864
	* * * * *	
USA300_Coa	GTAGTAAAGAGAGAGAGAAAGTTGAAGAACCTCAAGCACCTAAAGTTGATAACCAACAA	1011
N315_Coa	GTTGTAAAGAGAGAGAGAAAGTTGAAGAACCTCAATTACCTAAAGTTGGAAACCAAGCAA	996
MRSA252_Coa	GTTGTAAAGAGAGAGAGAAAGTTGAAGAACCTCAATTACCTAAAGTTGGAAACCAAGCAA	1011
MW2_Coa	GTTGTAAAGAGAGAGAGAAAGTTGAAGAACCTCAATCACCTAAATTTGATAACCAACAA	1002
WIS_Coa	GTTGTAAAGAGAGAGAGAAAGTTGAAGAACCTCAATCACCTAAAGTTTCTGAAAAAGTG	924
	* * * * *	
USA300_Coa	GAGGTTAAACTACGGCTGGTAAAGCTGAAGAAACAAACAAACCAAGTTGCACAACCATTA	1071
N315_Coa	GAGGTTAAACTACGGCTGGTAAAGCTGAAGAAACAAACAAACCAAGTTGGCACAGCCATTA	1056
MRSA252_Coa	GAGGATAAAATTACAGTTGGTACAACCTGAAGAAAGCAACCATTAACCAATTGCGCAACCACTA	1071
MW2_Coa	GAGGTTAAATTTACAGTTGATAAAGCTGAAGAAACAAACAAACCAAGTTGGCACAGCCATTA	1062
WIS_Coa	GATGTTCAAGGAAACGGTTGGTACAACCTGAAGAAAGCAACCATTAACCAATTGCGCAACCACTA	984
	* * * * *	
USA300_Coa	GTTAAATTTCCACAGGGCACAATTACAGGTGAAATTTGATAAAGGTCCGGAATATCCAACG	1131
N315_Coa	GTAAATTTCCACAGGAAACAATCTATGGTGAAACTGTAAAGGTCCGGAATATCCAACG	1116
MRSA252_Coa	GTTAAATTTCCACAGGGCACAATTCAAGGTGAAATTTGATAAAGGTCCGGAATATCTAAGC	1131
MW2_Coa	GTTAAATTTCCACAGGGCACAATTACAGGTGAAATTTGATAAAGGTCCGGAATATCCAACG	1122
WIS_Coa	GTTAAATTTACCACAATTTGGGACTCAAGGGCAAAATTTGATAAAGGTCCCGACTATCCAAC	1044
	* * * * *	
USA300_Coa	ATGGAAAAATAAACGGTACAGGTGAAATCGTTCAAGGTCCCGATTTTCTAACAATGGAA	1191
N315_Coa	ATGGAAAAATAAACGGTACAGGTGAAATCGTTCAAGGTCCCGATTTTCTAACAATGGAA	1176
MRSA252_Coa	ATGGAAAAATAAACGGTACAGGTGAAATCGTTCAAGGTCCAGATTTCCCAACAATGGAA	1191
MW2_Coa	ATGGAAAAATAAACGGTACAGGTGAAATCGTTCAAGGTCCAGATTTCCCAACAATGGAA	1182
WIS_Coa	ATGGAAAAATAAACGGTACAGGTGAAATCGTTCAAGGTCCAGATTTCCCAACAATGGAA	1104
	* * * * *	
USA300_Coa	CAAAGCGGCCCATCATTAAGCAATAATTATACAAACCCA-----	1230
N315_Coa	CAAACAGACCATCTTTAAGCGATAATTATACTCAACCG-----	1215
MRSA252_Coa	CAAACAGACCATCTTTAAGCGATAATTATACTCAACCG-----	1230

ES 2 806 945 T3

MW2_Coa	CAAAACAGACCATCTTTAAGCGATAATTATACTCAACCG-----	1221
WIS_Coa	CAAAACAGACCATCTTTAAGTGACAATTATACACAACCATCTGTGACTTTACCGTCAATT	1164
	**** * * **** * * * * * * * * * * * * * *	
USA300_Coa	-----CCGTTAACGAACCCCTATTTTAGAAGGTCCTGAAGGTAGCTCATCTAAA	1278
N315_Coa	-----ACGACACCGAACCCCTATTTTAGAAGGTCCTGAAGGTAGCTCATCTAAA	1263
MRSA252_Coa	-----ACGACACCGAACCCCTATTTTAAAAGGTATTTGAAGGAACTCAACTAAA	1278
MW2_Coa	-----ACGACACCGAACCCCTATTTTAGAAGGTCCTGAAGGTAGCTCATCTAAA	1269
WIS_Coa	ACAGGTGAAAGTACACCAACGAACCCCTATTTTAAAAGGTATTTGAAGGAACTCATCTAAA	1224
	* *	
USA300_Coa	CTTGAAATAAAACCACAAGGTACTGAATCAACGTTAAAAGGTACTCAAGGAGAATCAAGT	1338
N315_Coa	CTTGAAATAAAACCACAAGGTACTGAATCAACGTTGAAAGGTATTTCAAGGAGAATCAAGT	1323
MRSA252_Coa	CTTGAAATAAAACCACAAGGTACTGAATCAACGTTAAAAGGTACTCAAGGAGAATCAAGT	1338
MW2_Coa	CTTGAAATAAAACCACAAGGTACTGAATCAACGTTAAAAGGTACTCAAGGAGAATCAAGT	1329
WIS_Coa	CTTGAAATAAAACCACAAGGTACTGAATCAACGTTGAAAGGTATTTCAAGGAGAATCAAGT	1284

USA300_Coa	GATATTGAAGTTAAACCTCAAGCAACTGAAACAACAGAAGCTTCTCAATATGGTCCGAGA	1398
N315_Coa	GATATTGAAGTTAAACCTCAAGCAACTGAAACAACAGAAGCTTCTCAATATGGTCCGAGA	1383
MRSA252_Coa	GATATTGAAGTTAAACCTCAAGCAACTGAAACAACAGAAGCATCACATTATCCAGCGAGA	1398
MW2_Coa	GATATTGAAGTTAAACCTCAAGCAACTGAAACAACAGAAGCATCACATTATCCAGCAAGA	1389
WIS_Coa	GATATTGAAGTTAAACCTCAAGCAACTGAAACAACAGAAGCATCACATTATCCAGCGAGA	1344

USA300_Coa	CCGCAATTTAACAAAACACCTAAATATGTTAAATATAGAGATGCTGGTACAGGTATCCGT	1458
N315_Coa	CCGCAATTTAACAAAACACCTAAGTATGTGAAATATAGAGATGCTGGTACAGGTATCCGT	1443
MRSA252_Coa	CCTCAATTTAACAAAACACCTAAGTATGTGAAATATAGAGATGCTGGTACAGGTATCCGT	1458
MW2_Coa	CCTCAATTTAACAAAACACCTAAATATGTTAAATATAGAGATGCTGGTACAGGTATCCGT	1449
WIS_Coa	CCGCAATTTAACAAAACACCTAAATATGTGAAATATAGAGATGCTGGTACAGGTATCCGT	1404
	** *	
USA300_Coa	GAATACAACGATGGAACATTTGGATATGAAGCGAGACCAAGATTCAATAAGCCA-----	1512
N315_Coa	GAATACAACGATGGAACATTTGGATATGAAGCGAGACCAAGATTCAACAAGCCAAGTGAA	1503
MRSA252_Coa	GAATACAACGATGGAACATTTGGATATGAAGCGAGACCAAGATTCAACAAGCCAAG----	1514
MW2_Coa	GAATACAACGATGGAACATTTGGATATGAAGCGAGACCAAGATTCAATAAGCCATCAGAA	1509
WIS_Coa	GAATACAACGATGGAACATTTGGATATGAAGCGAGACCAAGATTCAACAAGCCATCAGAA	1464

USA300_Coa	-----TCA-----	1515
N315_Coa	ACAAATGCATACAACGTAACGACAAATCAAGATGGCACAGTATCATACGGAGCTCGCCCA	1563
MRSA252_Coa	-----C-----	1515
MW2_Coa	ACAAACGCATACAACGTAACGACAAATCAAGATGGCACAGTAACATATGGCGCTCGCCCA	1569
WIS_Coa	ACAAACGCATACAACGTAACGACAAATCAAGATGGCACAGTATCATATGGGGCTCGCCCA	1524
	*	
USA300_Coa	-----GAAACAAATGCATATAACGTAACAACACATGCAAAATGGTCAA	1557
N315_Coa	ACACAAAACAGCCAAAGTGAAACAAACGCATATAACGTAACAACACATGCAAAATGGTCAA	1623
MRSA252_Coa	-----GAAACAAATGCATACAACGTAACGACAAATCAAGATGGGCACA	1557
MW2_Coa	ACACAAAACAAACCAAGCAAAAACAAATGCATACAACGTAACAACACATGCAAAATGGTCAA	1629
WIS_Coa	ACACAAAACAAAGCCAAAGCAAAAACAAATGCATATAACGTAACAACACATGCAAAACGGCCAA	1584
	***** * * * * * * * * * * * * * * * *	
USA300_Coa	GTATCATACGGAGCTCGTCCGACA-----	1581
N315_Coa	GTATCATACGGTGTCTCGCCCAACA-----	1647
MRSA252_Coa	GTATCATATGGCGCTCGCCCGACA-----	1581
MW2_Coa	GTATCATATGGCGCTCGCCCGACA-----	1653
WIS_Coa	GTATCATATGGCGCTCGCCCGACATACAACAAGCCAAAGTGAAACAAATGCATACAACGTA	1644
	***** * * * * * * * * * * * * * * * *	
USA300_Coa	-----CAAAACAAGCCAAAGC	1596
N315_Coa	-----CAAAAAAGCCAAAGC	1662
MRSA252_Coa	-----CAAAACAAGCCAAAGC	1596
MW2_Coa	-----CAAAACAAGCCAAAGC	1668
WIS_Coa	ACGACAAATCGAGATGGCACAGTATCATATGGCGCTCGCCCGACACAAAACAAGCCAAAGC	1704

USA300_Coa	AAAACAAACGCATATAACGTAACAACACATGGAAACGGCCAAAGTATCATATGGCGCTCGC	1656
N315_Coa	AAAACAAATGCATACAACGTAACAACACATGCAAAATGGTCAAGTATCATATGGCGCTCGC	1722
MRSA252_Coa	GAAACAAACGCATATAACGTAACAACACATGCAAAACGGCCAAAGTATCATACGGAGCTCGT	1656
MW2_Coa	AAAACAAATGCATATAACGTAACAACACATGCAAAATGGTCAAGTATCATACGGAGCTCGC	1728
WIS_Coa	GAAACGAATGCATATAACGTAACAACACACGAAATGGCCAAAGTATCATATGGCGCTCGT	1764

ES 2 806 945 T3

```

          ***  *  *****  *****  *  ***  *  *****  *  *****

USA300__Coa      CCAACACAAAAACAAGCCAAGCAAAACAAATGCATACAACGTAACAACACATGCAAACGGT 1716
N315__Coa       CCGACACAAAAAAGCCAAGCAAAACAAATGCATATAACGTAACAACACATGCAAATGGT 1782
MRSA252__Coa    CCGACACAAAAACAAGCCAAGCGAAACGAACGCATATAACGTAACAACACATGCAAACGGT 1716
MW2__Coa        CCGACACAAAAACAAGCCAAGCAAAACAAATGCATATAACGTAACAACACACGCAAACGGT 1788
WIS__Coa        CCGACACAAAAAGAAGCCAAGCAAAACAAATGCATATAACGTAACAACACATGCAAACGGC 1824
          ***  *****  *****  ***  *  *****  *****  *****  *****

USA300__Coa      CAAGTGTCATACGGAGCTCGCCCGACATACAAGAAGCCAAGTAAACAAATGCATACAAT 1776
N315__Coa       CAAGTATCATACGGAGCTCGCCCGACATACAAGAAGCCAAGCGAAACAAATGCATACAAC 1842
MRSA252__Coa    CAAGTGTCATACGGAGCTCGCCCAACACAAAAACAAGCCAAGTAAACAAATGCATACAAT 1776
MW2__Coa        CAAGTGTCATACGGAGCTCGCCCGACATACAAGAAGCCAAGTAAACAAATGCATACAAT 1848
WIS__Coa        CAAGTATCATATGGCGCTCGTCCGACATACAACAAGCCAAGTAAACAAATGCATACAAT 1884
          *****  *****  *  *****  *  ***  *  *  *****  *****

USA300__Coa      GTAACAACACATGCA----- 1791
N315__Coa       GTAACAACACATGCAAAATGGTCAAGTATCATATGGCGCTCGCCCGACACAAAAAAGCCA 1902
MRSA252__Coa    GTAACAACACATGCA----- 1791
MW2__Coa        GTAACAACACATGCA----- 1863
WIS__Coa        GTAACAACACATGCA----- 1899
          *****

USA300__Coa      -----GATGGTACTGCGACATATGGGCCT 1815
N315__Coa       AGCGAAACAAACGCATATAACGTAACAACACATGCAGATGGTACTGCGACATATGGGCCT 1962
MRSA252__Coa    -----GATGGTACTGCGACATATGGTCCT 1815
MW2__Coa        -----GATGGTACTGCGACATATGGGCCT 1887
WIS__Coa        -----GATGGTACTGCGACATATGGTCCT 1923
          *****  *****

USA300__Coa      AGAGTAACAAAATAA 1830
N315__Coa       AGAGTAACAAAATAA 1977
MRSA252__Coa    AGAGTAACAAAATAA 1830
MW2__Coa        AGAGTAACAAAATAA 1902
WIS__Coa        AGAGTAACAAAATAA 1938
          *****

```

FIG. 8A

```

USA300_D1D2      IVTKDYSGKSQVNAGSKNGTLDISRYLNSALYILEDYIIYAIGLTNKYEYGDNIYKEAKD 60
Newman_D1D2      IVTKDYSGKSQVNAGSKNGTLDISRYLNSALYILEDYIIYAIGLTNKYEYGDNIYKEAKD 60
N315_D1D2        IVTKDYSKESRVNEKSKKGATVSDYIYWKIIDSLEAQFTGAIDLLEDYKYGDPIYKEAKD 60
MU50_D1D2        IVTKDYSKESRVNEKSKKGATVSDYIYWKIIDSLEAQFTGAIDLLEDYKYGDPIYKEAKD 60
MRSA252_D1D2     IVTKDYSKESRVNENSKYDTPIDPWYLGSIILNRLGDQIYYAKELTNKYEYGEKEYKQAI 60
85/2082_D1D2     IVTKDYSKESRVNENSKYDTPIDPWYLGSIILNRLGDQIYYAKELTNKYEYGEKEYKQAI 60
MW2_D1D2         IVTKDYSGKSQVNAGSKNGKQIADGYWGIENLENQFYNI PHLLDQHKYAEKEYKDAVD 60
WIS_D1D2         IVTKDYSGKSQVNAGSKNGKQIADGYWGIENLENQFYNI PHLLDQHKYAEKEYKDALD 60
***** :*: ** * . : . * : * : * :.:*: : ***: * *

USA300_D1D2      RLLEKVLREDQYLLERKKSQYEDYKQWYANYKKENPRTDLKMANFHKYNLEELSMKEYNE 120
Newman_D1D2      RLLEKVLREDQYLLERKKSQYEDYKQWYANYKKENPRTDLKMANFHKYNLEELSMKEYNE 120
N315_D1D2        RLMTRVLGEDQYLLKKKIDYEYLYKKWKYKSSNK-----NTNMLTFHKYNLYNTMTMNEYND 115
MU50_D1D2        RLMTRVLGEDQYLLKKKIDYEYLYKKWKYKSSNK--- --NTNMLTFHKYNLYNTMTMNEYND 115
MRSA252_D1D2     KLMTRVLGEDHYLLEKKKAQYEA YKKWFEKHKSENPHSSSLKKIKFDDFDLYRLTKKEYNE 120
85/2082_D1D2     KLMTRVLGEDHYLLEKKKAQYEA YKKWFEKHKSENPHSSSLKKIKFDDFDLYRLTKKEYNE 120
MW2_D1D2         KLKTRVLEEDQYLLERKKEKYEIYKELYKKYKKENPNTQVKMKAFDKYDLGDLTMEYND 120
WIS_D1D2         KLKTRVLEEDQYLLERKKEKYEIYKELYKKYKKENPNTQVKMKAFDKYDLGDLTMEYND 120
: * : ** ***: ***: : * : ** * : : . : . : * :.:*: * : : ***:

USA300_D1D2      LQDALKRALDDPHREVKDIDKDNSDLKTFNAAEEDKATKEVYDLVSEIDTLVVSYYGDKD 180
Newman_D1D2      LQDALKRALDDPHREVKDIDKDNSDLKTFNAAEEDKATKEVYDLVSEIDTLVVSYYGDKD 180
N315_D1D2        IFNSLKDAVYQFNKEVKEIEHKNVDLKQFDKDGEDKATKEVYDLVSEIDTLVVTYYADKD 175
MU50_D1D2        IFNSLKDAVYQFNKEVKEIEHKNVDLKQFDKDGEDKATKEVYDLVSEIDTLVVTYYADKD 175
MRSA252_D1D2     LHQSLKEAVDEFNSEVKNIQSKQKDLLPYDEATENRVVTNGIYDFVCEIDTLYAAYFNHSQ 180
85/2082_D1D2     LHQSLKEAVDEFNSEVKNIQSKQKDLLPYDEATENRVVTNGIYDFVCEIDTLYAAYFNHSQ 180
MW2_D1D2         LSKLLTKALDNFKLEVKKIESENPDLPYPSESEERTAYGKIDSLVDQAYSVYFAYVTD AQ 180
WIS_D1D2         LSKLLTKALDNFKLEVKKIESENPDLPYPSESEERTAYGKIDSLVDQAYSVYFAYVTD AQ 180
: . * . *: :*: ***: :.: ** :. * . :.:*: :.: :* . :

USA300_D1D2      YGEHAKELRAKLDLILGDTDNPHKITNERIKKEMIDDLNSIIDFFMETKQNRPKSITKY 240
Newman_D1D2      YGEHAKELRAKLDLILGDTDNPHKITNERIKKEMIDDLNSIIDFFMETKQNRPKSITKY 240
N315_D1D2        YGEHAKELRAKLDLILGDTDNPHKITNERIKKEMIDDLNSIIDFFMETKQNRPKSITKY 235
MU50_D1D2        YGEHAKELRAKLDLILGDTDNPHKITNERIKKEMIDDLNSIIDFFMETKQNRPKSITKY 235
MRSA252_D1D2     YCHNAKELRAKLDLILGDAKDPVIRITNERIRKEMMDLNSIIDFFMDTNMNRPLNITKF 240
85/2082_D1D2     YCHNAKELRAKLDLILGDAKDPVIRITNERIRKEMMDLNSIIDFFMDTNMNRPLNITKF 240
MW2_D1D2         HKTEALNLRAKIDLILGDEKDPVIRVTNQRTKEMIKDLESIIDFFFIETKLNRPKHITRY 240
WIS_D1D2         HKTEALNLRAKIDLILGDEKDPVIRVTNQRTKEMIKDLESIIDFFFIETKLNRPKHITRY 240
: . * : ***: :.: ***: :*: :*: ***: :.: ***: :.: ***: :.: ***: :.: ***:

USA300_D1D2      NPPTHNYKTNSDNKPNFDKLVETKKAVKEADDSWKKKT VVK 282
Newman_D1D2      NPPTHNYKTNSDNKPNFDKLVETKKAVKEADDSWKKKT VVK 282
N315_D1D2        DPTKHNPFKEKSENKPNFDKLVETKKAVKEADESWKKNKT VVK 277
MU50_D1D2        DPTKHNPFKEKSENKPNFDKLVETKKAVKEADESWKKNKT VVK 277
MRSA252_D1D2     NPNIHDYTNKPNRDNFDKLVKETREAVANADESWKTRTVKN 282
85/2082_D1D2     NPNIHDYTNKPNRDNFDKLVKETREAVANADESWKTRTVKN 282
MW2_D1D2         DGTKHDIYHK---HKDGFDA LVKETREAVAKADESWKKNKT VVK 279
WIS_D1D2         DGTKHDIYHK---HKDGFDA LVKETREAVSKADESWKTKTVKK 279
: . *: : :. ** ***: ***: :*: ***: ***: :.: ***:

```

FIG. 8B

Alineamiento de vwb de cepas investigadas

```

USA300_vwb -----
Newman_vwb TTGAAAAATAAATTGCTAGTTTTTATCATTTGGGAGCATTATGTTGATCACAATAATTGGGAA 60
MW2_vwb TTGAAAAATAAATTGCTAGTTTTTATCATTTGGGAGCATTATGTTGATCACAATAATTGGGAA 60
MRSA252_vwb TTGAAAAATAAATTGCTAGTTTTTATCATTTGGGAGCATTATGTTGATCACAATAATTGGGAA 60
N315_vwb TTGAAAAATAAATTGCTAGTTTTTATCATTTGGGAGCATTATGTTGATCACAATAATTGGGAA 60

USA300_vwb -----GTGGTTTCTGGGGAGAAGAATCCATATGTTCTGAGTCGTTG 42
Newman_vwb AGTAATCGTGCAGTGCAGTGGTTTCTGGGGAGAAGAATCCATATGTTCTGAGTCGTTG 120
MW2_vwb AGTAATCGTGCAGTGCAGTGGTTTCTGGGGAGAAGAATCCATATGTTCTGAGTCGTTG 120
MRSA252_vwb AGCAATCGTGCAGTGCAGTGGTTTCTGGGGAGGAGAATCCATATAAATCTGAGTCATTG 120
N315_vwb AGTAATCATGCGAGTGCAGTGGTTTCTGGGGAGAAGAATCCATATGTTCTGATCAAAAGCTTTA 120
*****

USA300_vwb AAACCTGACTAATAATAAAAAATAAATCTAGAAC-AGTAGAAGAGTATAAGAAAAGCTTTGGA 101
Newman_vwb AAACCTGACTAATAATAAAAAATAAATCTAGAAC-AGTAGAAGAGTATAAGAAAAGCTTTGGA 179
MW2_vwb AAACCTGACTAATAATAAAAAATAAATCTAGAAC-AGTAGAAGAGTATAAGAAAAGCTTTGGA 179
MRSA252_vwb AAATTAAATGGGAAAAGAAGTACTACAATAACTAGT-GATAAATATGAAGAAAATTTAGA 179
N315_vwb GAATTGAAAGATAAAAGTAATAAATCCAATTCTTAC-GAAAATATAGAGATAGTTTAGA 179
***

USA300_vwb TGATTTAATATGGTCCTTTTCCAACTTAGATAATGAAAGATTTGATAATCCTGAATATAA 161
Newman_vwb TGATTTAATATGGTCCTTTTCCAACTTAGATAATGAAAGATTTGATAATCCTGAATATAA 239
MW2_vwb TGATTTAATATGGTCCTTTTCCAACTTAGATAATGAAAGATTTGATAATCCTGAATATAA 239
MRSA252_vwb TATGTTAATATCGTCATTATCATTTGTCAGATTATGAAAAATATGAGGAACCGAATACAA 239
N315_vwb AAGTTTGATTTCATCATTTATCTTTTGTCTGATTATGAAAAATATGAAGAGCCAGAATATGA 239
***

USA300_vwb AGAAGCTATGAAAAAATATCAACAGAGATTTATGGCTGAAGATGAGGCTTTGAAGAAATT 221
Newman_vwb AGAAGCTATGAAAAAATATCAACAGAGATTTATGGCTGAAGATGAGGCTTTGAAGAAATT 299
MW2_vwb AGAAGCTATGAAAAAATATCAACAGAGATTTATGGCTGAAGATGAGGCTTTGAAGAAATT 299
MRSA252_vwb AGAAGCTATGAAAAAATATCAACAGAGATTTATGGCTGAAGATGATGCATT-AAAAAATT 298
N315_vwb AAAGGCTGTAAAAAATATCAACAGAGATTTATGGCTGAAGATGATGCATTAAAAAATT 299
*

USA300_vwb TTTTAGTGAAGAGAAAAAATAAAAAATGGAATACTGATA----ATTTAGATTATCTA--- 276
Newman_vwb TTTTAGTGAAGAGAAAAAATAAAAAATGGAATACTGATA----ATTTAGATTATCTA--- 354
MW2_vwb TTTTAGTGAAGAGAAAAAATAAAAAATGGAATACTGATA----ATTTAGATTATCTA--- 354
MRSA252_vwb TTTTAGTGAAGAGAAAAAATAAAAAATAGAAATACTAATA---CATCAAATTTCTG--- 353
N315_vwb TTTAAATGAAGAAAAGAAGATAAAAAATGCAGATATTAGCAGAAAAATCGAATAATTTATT 359
***

USA300_vwb --GGATTATCTCATGAAAGATATGAAAGTGTATTTAATACCTTTGAAAAACAAAGTGAGGA 335
Newman_vwb --GGATTATCTCATGAAAGATATGAAAGTGTATTTAATACCTTTGAAAAACAAAGTGAGGA 413
MW2_vwb --GGATTATCTCATGAAAGATATGAAAGTGTATTTAATACCTTTGAAAAACAAAGTGAGGA 413
MRSA252_vwb --GGATTAAACACACGAAAGATATGAGTCAATTTATAATTCATTAAAAAATCATCGTGAAGA 412
N315_vwb AGGTTTAAACACATGAAAGATATTTCTTATATTTTGGATACATTAAAGAAAAATAAACAAGA 419
**

USA300_vwb GTTCTTTAAAGAAATTGAAGATATAAAAAAAGATAACCCCTGAATTGAAAGACTTTAATGA 395
Newman_vwb GTTCTTTAAAGAAATTGAAGATATAAAAAAAGATAACCCCTGAATTGAAAGACTTTAATGA 473
MW2_vwb GTTCTTTAAAGAAATTGAAGATATAAAAAAAGATAACCCCTGAATTGAAAGACTTTAATGA 473
MRSA252_vwb ATTTTCAAAAGAAATCGAAGAAATTAATAATAAAAAATCCAGTGTAAAGAAATATAACAA 472
N315_vwb GTTTTAAAGATATTGAAGAAATACAACCTGAAAAATAGTGAATTTAAAGGACTTTAACAA 479
**

USA300_vwb AGAGGAGCAATTAAAGTGCAGCTTAGAATTAACAAATTAGAAAAATCAGATATTAATGTT 455
Newman_vwb AGAGGAGCAATTAAAGTGCAGCTTAGAATTAACAAATTAGAAAAATCAGATATTAATGTT 533
MW2_vwb ATAG----- 477
MRSA252_vwb AGAGGAACAACTAAAGCTGATACGGAATTAACACTCTTGAAAAATCAAGTACTAATGAT 532
N315_vwb TACAGAGCAACATAATGCCGACGTAGAAATAAACAAATTTAGAAAAATAAGTATTAATGGT 539

USA300_vwb AGGTAAACATTTTATCAAACTATAGAGATGATGTTGAAAGTTTATATAGTAAGTTAGA 515
Newman_vwb AGGTAAACATTTTATCAAACTATAGAGATGATGTTGAAAGTTTATATAGTAAGTTAGA 593
MW2_vwb -----
MRSA252_vwb AGGTTATACATTTTATCACTCGAATAAAAAATGAAGTAGAAGATTTATATAACAAATTAGA 592
N315_vwb AGGGTATACATTTCTATAATACAAATAAGGACGAAGTTGAAGAATTATATAGTGAGTTAGA 599

```

ES 2 806 945 T3

USA300_vwb	TTTAATTATGGGATATAAAGATGAAGAAAGA--GCAAATAAAAAAGCAGTTAACAAAAG	572
Newman_vwb	TTTAATTATGGGATATAAAGATGAAGAAAGA--GCAAATAAAAAAGCAGTTAACAAAAG	650
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	TATGATTCTTGGTTATAAAGATGAAGAGAGA--AAAAAGAGAGGGCTACCAATCAAAG	649
N315_vwb	TTTGATTGTTGGA---GAAGTTCAAGATAAGTCGGATAAAAAAAGAGCAGTAAATCAAAG	656
USA300_vwb	GATGTTAGAAAATAAAAAAGAAGACTTAGAAACCATAATTGATGAATTTTTTACTGATAT	632
Newman_vwb	GATGTTAGAAAATAAAAAAGAAGACTTAGAAACCATAATTGATGAATTTTTTACTGATAT	710
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	AATGTTCAATAATAAAAAAGAGGATTTAGAACTATTATTGATGAATTTTGGAGAAAT	709
N315_vwb	GATGTTAAATAGAAAAAAGAGGATTTAGAATTTATTATAGATAAATTTTTTAAAAAAT	716
USA300_vwb	AGATAAAACAAGACCTAATAA-TATTCCTGTTT TAGAAGATGAAAAACAAGAAGAGAAAA	691
Newman_vwb	AGATAAAACAAGACCTAATAA-TATTCCTGTTT TAGAAGATGAAAAACAAGAAGAGAAAA	769
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	TGG-ACAACAAGGCCAATCTATACCAACATTAGCGCCTAAAGAAGAAAAAGAAACA	768
N315_vwb	TCA-ACAAGACGTCCAGAGAGTATACCAGCATTAAGTAGTAAAAA-AATCATAATCAG	774
USA300_vwb	ATCATAAAAAATATGGCTCAATTAAAACTGACACTGAAGCAGCAAAAAGTGATGAATCAA	751
Newman_vwb	ATCATAAAAAATATGGCTCAATTAAAACTGACACTGAAGCAGCAAAAAGTGATGAATCAA	829
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	ATATAAAAAATGCAATAAATTAAAACTGACACTGAAGCAGCAAAAATGATGAAGCAA	828
N315_vwb	ACTATGGCATT-----AAGTTAAAGCAGATACAGAAGCTGCTAAAAATGACGTATCAA	829
USA300_vwb	AAAGAAGCAAGAGAAGTAAAGAAAGTTTAAATACTCAAAATCACAACCTGCATCTCAAG	811
Newman_vwb	AAAGAAGCAAGAGAAGTAAAGAAAGTTTAAATACTCAAAATCACAACCTGCATCTCAAG	889
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	AAAGAAG-----TTTAAATACCCACAATCACAATCTGTATCTCAAG	870
N315_vwb	AAAGAAG-----TAAAGAAAGTTTAAATACTCAAAATTAATAATCTACAAACACAAG	880
USA300_vwb	AAGTTTCTGAACAACAAAAAGCTGAATATGATAAAGAGCAGAAAGAAAAGCGAGAT	871
Newman_vwb	AAGTTTCTGAACAACAAAAAGCTGAATATGATAAAGAGCAGAAAGAAAAGCGAGAT	949
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	AAGTCTCTGAACAACAAAAAGCTGACTACGAAAGAAAAGCTGAAGAAAAGAAAAGCGAGAT	930
N315_vwb	AAATTTCTGAAGAACA AAAAGCTGAATATCAAAGAAAGTCAGAGGCATTAAGAAAAGAT	940
USA300_vwb	TTTTGGATAATCAAAAAATTAAGAAAAACACCTGTAGTGTTCATTAGAATATGATTTTGAGC	931
Newman_vwb	TTTTGGATAATCAAAAAATTAAGAAAAACACCTGTAGTGTTCATTAGAATATGATTTTGAGC	1009
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	TTTATAGATAAGCAAAAAATAAGAAAACCTCCTGTAGTTTCATTAGAATATGATTTTGAGC	990
N315_vwb	TTATAAACAGACAAAAATCTAAAAATGAGTCTGTGGTTTCACTAA-----TCGATG	991
USA300_vwb	ATAAACCAACGTATTGACAACGAAAACGACAAGAACTTGTGGTTTCTGCACCAACAAAAGA	991
Newman_vwb	ATAAACCAACGTATTGACAACGAAAACGACAAGAACTTGTGGTTTCTGCACCAACAAAAGA	1069
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	ATAAACCAACGTATTGACAACGAAAACGACAAGCAACTTGTGGTTTCTGCACCAACAAAAGA	1050
N315_vwb	ACGAAGA-----CGACAACGAAAACGACAGGCAACTTGTGGTTTCTGCACCAACAAAAGA	1045
USA300_vwb	AACCAACATCACCGACTACATATACTGAAACAACGACACAGGTACCAATGCCTACAGTTG	1051
Newman_vwb	AACCAACATCACCGACTACATATACTGAAACAACGACACAGGTACCAATGCCTACAGTTG	1129
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	AACCAACAACACCGCTACATACACTGAAACAACGACACAGGTACCAATGCCTACAGTTG	1110
N315_vwb	AACCAACAACACCGACTACATATACTGAAACAACGACTCAGGTACCAATGCCTACAGTTG	1105
USA300_vwb	AGCGTCAAACCTCAGCAACAAATTATTTATAATGCACCAAAACAATTGGCTGGATTAAATG	1111
Newman_vwb	AGCGTCAAACCTCAGCAACAAATTATTTATAATGCACCAAAACAATTGGCTGGATTAAATG	1189
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	AGCGTCAAACACAGCAACAAATCGTTTACAAAAGCACCACCAAAACCATTAGCTGGATTAAATG	1170
N315_vwb	AGCGTCAAACCTCAGCAACAAATCGTTTACAAAACACCAAAACCATTAGCTGGATTAAATG	1165
USA300_vwb	GTGAAAGTCATGATTTTCACAACAACCGCATCAATCACCAACAACCTTCAATCACACGCATA	1171
Newman_vwb	GTGAAAGTCATGATTTTCACAACAACCGCATCAATCACCAACAACCTTCAATCACACGCATA	1249

ES 2 806 945 T3

MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	GTGAAAGTCATGATTTCACAACAACGCATCAATCACCAACTACTTCAAATCACACGCATA	1230
N315_vwb	GTGAAAGTCATGATTTCACAACAACGCATCAATCACCAACAACCTCAAATCATACGCATA	1225
USA300_vwb	ATAATGTTGTTGAATTTGAAGAAACGTCCTGCTTTACCTGGTAGAAAATCAGGATCACTGG	1231
Newman_vwb	ATAATGTTGTTGAATTTGAAGAAACGTCCTGCTTTACCTGGTAGAAAATCAGGATCACTGG	1309
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	ATCATCTTATTGAAATTGAAGAAACATCTGCTTTACCTGGTAGAAAAGACAGGTTCAATTGG	1290
N315_vwb	ATAATGTTGTTGAATTTGAAGAAACGTCCTGCTTTACCTGGTAGAAAATCAGGATCACTGG	1285
USA300_vwb	TTGGTATAAGTCAAATTGATTCTTCTCATCTAACTGAACGTGAGAAGCGTGTAATTAAGC	1291
Newman_vwb	TTGGTATAAGTCAAATTGATTCTTCTCATCTAACTGAACGTGAGAAGCGTGTAATTAAGC	1369
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	TTGGTTTGAGTCAAATTGATTCTTCCGATTAACTGAACGTGAGAAGCGCGTGATTAAAC	1350
N315_vwb	TTGGTATAAGTCAAATTGATTCTTCTCATCTAACTGAACGTGAGAAGCGTGTAATCAAGC	1345
USA300_vwb	GTGAACACGTTAGAGAAGCTCAAAAGTTAGTTGATAATTATAAAGATACACATAGTTATA	1351
Newman_vwb	GTGAACACGTTAGAGAAGCTCAAAAGTTAGTTGATAATTATAAAGATACACATAGTTATA	1429
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	GTGAACACGTTAGAGAAGCTCAAAAGTTAGTTGATAATTATAAAGATACACATAGTTATA	1410
N315_vwb	GTGAACACGTTAGAGAAGCTCAAAAGTTAGTTGATAATTATAAAGATACACATAGTTATA	1405
USA300_vwb	AAGACCGAATAAATGCACAACAAAAAGTAAATACTTTAAGTGAAGGTCATCAAAAACGTT	1411
Newman_vwb	AAGACCGAATAAATGCACAACAAAAAGTAAATACTTTAAGTGAAGGTCATCAAAAACGTT	1489
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	AAGACCGATTAAATGCCCAACAAAAAGTAAATACTTTAAGTGCAGGTCATCAAAAACGTT	1470
N315_vwb	AAGACCGATTAAATGCACAACAAAAAGTAAATACTTTAAGTGAAGGTCATCAAAAACGTT	1465
USA300_vwb	TTAATAAACAAATCAATAAAGTATATAATGGCAAATAA-----	1449
Newman_vwb	TTAATAAACAAATCAATAAAGTATATAATGGCAAATAA-----	1527
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	TTAATAAACAAATTAATAAAGTATATAATGGCAAATAATTAATGCATGGCTGCAAAGGAA	1530
N315_vwb	TTAATAAACAAATCAATAAAGTATACAAATGGCAAATAA-----	1503
USA300_vwb	-----	
Newman_vwb	-----	
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	ATAATGAGTTTGCCGTAAAAATTAACAACATTTTAACTAGCAATAAATAATCAAAAGTC	1590
N315_vwb	-----	
USA300_vwb	-----	
Newman_vwb	-----	
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	ATCATTTCAATGATGCAATCTAGTATAGTCCACATTCATAACAGGTGTGGACTATTACTT	1650
N315_vwb	-----	
USA300_vwb	-----	
Newman_vwb	-----	
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	TTTTCACCTTTATATTACGAAAAAATTATTATGCTTAACTATCAATATCAATAATTAAATT	1710
N315_vwb	-----	
USA300_vwb	-----	
Newman_vwb	-----	
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	TAAGCTGAAAAACAATAAAAAATGTTAAGACAACGTTTACTTCAAGTTAATTATTATACTG	1770
N315_vwb	-----	
USA300_vwb	-----	
Newman_vwb	-----	
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	AAAAATCTGGTATATAATGCTGTTAGTGAATATAACAGGAAAAATTAAATTGGTTATGATA	1830

ES 2 806 945 T3

N315_vwb	-----	
USA300_vwb	-----	
Newman_vwb	-----	
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	TTGAGTCTATATAAAGCAGAAATAACAGATGAAAAAGAAATTATTAGTTTTTAACATGAG	1890
N315_vwb	-----	
USA300_vwb	-----	
Newman_vwb	-----	
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	CACGCTATTTGCTACACAATTTTATGAATTCAAATCAGCCTAATGCATCAACAGAAAGTGT	1950
N315_vwb	-----	
USA300_vwb	-----	
Newman_vwb	-----	
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	TGATAAAAACTTTGTAGTTCCAGAATCGGGTATTAATAAAATTATTCCTCACTTACGATGA	2010
N315_vwb	-----	
USA300_vwb	-----	
Newman_vwb	-----	
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	ATTTAAAAAAGCACCAAAAGTAAATGTTAGTAATTTAGCTGACAACAAAAACTTTGTAGC	2070
N315_vwb	-----	
USA300_vwb	-----	
Newman_vwb	-----	
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	TTCTGAAGATAAATTGAATAAGATTGCAGATCCATCGGCAGCTAGTAAAAATTGTAGATAA	2130
N315_vwb	-----	
USA300_vwb	-----	
Newman_vwb	-----	
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	AAACTTTGCGGTACCAGAATCAAAATTAGGAATCATTGTACCAGAGTATAAAGAAATCAA	2190
N315_vwb	-----	
USA300_vwb	-----	
Newman_vwb	-----	
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	TAATCGAGTGAATGTAACAACAACAATCCAGCTTCAAAACAAGTTGACAAGCAAATTGT	2250
N315_vwb	-----	
USA300_vwb	-----	
Newman_vwb	-----	
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	TGCTAAAGACCCAGAGGTGAATAGATTTATTACGCCAAAATAAAGTBAACCATCGTTTCAT	2310
N315_vwb	-----	
USA300_vwb	-----	
Newman_vwb	-----	
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	TACTACGCAAAACCCACTATAAGAAAGTTATTACTTCATACAAATCAACACATGTACATAA	2370
N315_vwb	-----	
USA300_vwb	-----	
Newman_vwb	-----	
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	ACATGTAAACCATGCAACATCTTCTATCCATCATCACTTCTACTATTAAACCATCAGAAGC	2430
N315_vwb	-----	

ES 2 806 945 T3

```

USA300_vwb -----
Newman_vwb -----
MW2_vwb -----
MRSA252_vwb ACCTAGATATACACACCCATCTCAATCTCAATCGTTAATTATAAAATCATCATTTTGCAGT 2490
N315_vwb -----

```

```

USA300_vwb -----
Newman_vwb -----
MW2_vwb -----
MRSA252_vwb TCCTGGATACCATGGTCATAAAGTTGTAACACCAGGACAAGCTAGTATTAGAATTCATCA 2550
N315_vwb -----

```

```

USA300_vwb -----
Newman_vwb -----
MW2_vwb -----
MRSA252_vwb CTTTTGTGCTGTACCTCAAATAAATAGTTTTTAAGGTCATTCCATCATATGGTCACAATTC 2610
N315_vwb -----

```

```

USA300_vwb -----
Newman_vwb -----
MW2_vwb -----
MRSA252_vwb ACATCGTATGCATGTACCAAGTTTCCAAAATAACACAACAGCAACACATCAAAATGCAAA 2670
N315_vwb -----

```

```

USA300_vwb -----
Newman_vwb -----
MW2_vwb -----
MRSA252_vwb AGTAAATAAAACTTATAACTATAAATATTTTTATACCTATAAAGTAGTCAAAGGTGTAAA 2730
N315_vwb -----

```

```

USA300_vwb -----
Newman_vwb -----
MW2_vwb -----
MRSA252_vwb AAACATTTCTCATTTTCAAATCACATGGTTGTAAATTTGTTAAACCAGCATTAACAT 2790
N315_vwb -----

```

```

USA300_vwb -----
Newman_vwb -----
MW2_vwb -----
MRSA252_vwb CAAAAATGTAAATTATCAATATGCTGTTCCTCAAGTAATAGCCCTACACACGTTGTTCTCTGA 2850
N315_vwb -----

```

```

USA300_vwb -----
Newman_vwb -----
MW2_vwb -----
MRSA252_vwb GTTTCAGGGTATCTTACCAGCACCACGAGTATAAAAATTGACATTAAGTTTACGAGATAT 2910
N315_vwb -----

```

```

USA300_vwb -----
Newman_vwb -----
MW2_vwb -----
MRSA252_vwb GATAAATACCTATTATTTTAAACATAGTCTGCAATCTATGAGGTTGTAGGCTATGTTTTT 2970
N315_vwb -----

```

```

USA300_vwb -----
Newman_vwb -----
MW2_vwb -----
MRSA252_vwb TGCAGTTTATCAATAAACACCCATCAACAAATTATACCGTTTTCTACTTTAAAGTTGG 3030
N315_vwb -----

```

```

USA300_vwb -----

```

ES 2 806 945 T3

Newman_vwb	-----	
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	AAGTAACATAATCTTAAATAAAATATATTATTAATTAAGATAAAATATAAGACTCGAGATTA	3090
N315_vwb	-----	
USA300_vwb	-----	
Newman_vwb	-----	
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	TTGTTAATAGTTTGTTCATCGCAAGTTAATTATTGTTTCTAAAAATATTGCTATATAATTT	3150
N315_vwb	-----	
USA300_vwb	-----	
Newman_vwb	-----	
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	TCAATGGCGAAGAAAACAGGCTAAAAAAGTCGGTTTTTAAATCAAAGCAAATAAGGAGTA	3210
N315_vwb	-----	
USA300_vwb	-----	
Newman_vwb	-----	
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	AAAAATGAAAAGGAAAGTACTAGTATTAACAATGGGCGTACTTTGTGCGACACAATTATG	3270
N315_vwb	-----	
USA300_vwb	-----	
Newman_vwb	-----	
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	GCAAACGAATAATGCAAAGCTTTAGTGACAGAGAGTGGCGTTAATGATACTAAGCAATT	3330
N315_vwb	-----	
USA300_vwb	-----	
Newman_vwb	-----	
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	TACTGAAGTAACATCGGAAGAAAAAGTTATAAAAGATGCTATTTGGAAGTCAATGAAG	3390
N315_vwb	-----	
USA300_vwb	-----	
Newman_vwb	-----	
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	CTTTATTACTATCCCCAAAATGATTTGAAGGGATTAGGTGGAGAACACAACGATTACGA	3450
N315_vwb	-----	
USA300_vwb	-----	
Newman_vwb	-----	
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	AAAAATTACATATAGCACTCTTCTTAATAATGTTTTAGATTATCAATGAGTTCAAATA	3510
N315_vwb	-----	
USA300_vwb	-----	
Newman_vwb	-----	
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	CGTAGGCGGTAAATCAGGAGCTATGTTGGTTATAGTGAAATTTACTCATCATTTCAC	3570
N315_vwb	-----	
USA300_vwb	-----	
Newman_vwb	-----	
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	AGACCGCGACAAACGTGCTATCAGACGTGATCATGTTAAAGAAGCACAAAACCTTGATTAA	3630
N315_vwb	-----	
USA300_vwb	-----	
Newman_vwb	-----	
MW2_vwb	-----	

ES 2 806 945 T3

```
MRSA252_vwb      TGATTATAAATATACGCAAATATATGAAGACTTTGCTAAAGCTACTGCAAAGGTAAGTAC 3690
N315_vwb      -----

USA300_vwb      -----
Newman_vwb      -----
MW2_vwb         -----
MRSA252_vwb     ACTTAGTCAGTCTCACCAAAATTATTTAAATAAACAAATTGATAAAGTGAATAATAAGAT 3750
N315_vwb     -----

USA300_vwb      -----
Newman_vwb      -----
MW2_vwb         -----
MRSA252_vwb     AGAGAAAAC TGAAAAACGCTAA 3772
N315_vwb     -----
```

FIG. 9A

ES 2 806 945 T3

MW2_vWbp	VVSGEKNPYVSESLKLTNNKNSRTVVEEYKKSLLDDLIWSFPNLDNERFDNPEYKEAMKXY	60
Newman_vWbp	VVSGEKNPYVSESLKLTNNKNSRTVVEEYKKSLLDDLIWSFPNLDNERFDNPEYKEAMKXY	60
USA300_vWbp	VVSGEKNPYVSESLKLTNNKNSRTVVEEYKKSLLDDLIWSFPNLDNERFDNPEYKEAMKXY	60
N315_vWbp	VVSGEKNPYVSKALFLKDKSNKSNSEYENYEDSLESLSLSSLSFADYKYEYEPPEYKAVKXY	60
MRSA252_vWbp	VVSGEENPYKSESLKLNKGRSTTITS DKYEENLDMLISLSFADYKYEYEPPEYKAVKXY	60
	*****:*** *:***:*. .: : :*:...*: ** *:.. * *:***:***:***	
MW2_vWbp	QORFMAEDEALKKFFSEKKIKNGNTDN--LDYLGLSHERYESVFNTLKKQSEEFLLKEIE	118
Newman_vWbp	QORFMAEDEALKKFFSEKKIKNGNTDN--LDYLGLSHERYESVFNTLKKQSEEFLLKEIE	118
USA300_vWbp	QORFMAEDEALKKFFSEKKIKNGNTDN--LDYLGLSHERYESVFNTLKKQSEEFLLKEIE	118
N315_vWbp	QOKFMAEDDALKNFINEEKKIKNADISRKSNLLGLTHERYSYIFDTLKENQSEFLLKRIE	120
MRSA252_vWbp	QOKFMAEDDALKNFVLKRRK-----	80
	**:*	
MW2_vWbp	DIKKDNPELKDNE-----	132
Newman_vWbp	DIKKDNPELKDNEEQQLKCDLELNKLENQILMLGKTFYQNYRDDVESLYSKLDLIMGYK	178
USA300_vWbp	DIKKDNPELKDNEEQQLKCDLELNKLENQILMLGKTFYQNYRDDVESLYSKLDLIMGYK	178
N315_vWbp	DIQLKNSDILKDNNTTEQHNADVEINNLENKVLVVGYPYNTNKDEVEELYSELDLIVGEV	180
MRSA252_vWbp	-----	
MW2_vWbp	-----	
Newman_vWbp	DEERANKKAVNKRMLNKKEDLETIIDEFFSDIDKTRPNNIPVLEDEKQEEKNHKNMAQL	238
USA300_vWbp	DEERANKKAVNKRMLNKKEDLETIIDEFFSDIDKTRPNNIPVLEDEKQEEKNHKNMAQL	238
N315_vWbp	QDKSDKKRAVNQRMLNKKEDLEFIIDKFFPKIQQERPEIPALTSEKN--HNQTMALKL	238
MRSA252_vWbp	-----	
MW2_vWbp	-----	
Newman_vWbp	KSDTEAAKSDESKRSKRSKRSKRSNTQNHKSPASQEVSEQQKAEDKRAEERKARFLDNQKIK	298
USA300_vWbp	KSDTEAAKSDESKRSKRSKRSKRSNTQNHKSPASQEVSEQQKAEDKRAEERKARFLDNQKIK	298
N315_vWbp	KADTEAAKNDVSKRSKRS---LNTQNNKSTTQEISEEQKAEDYQKSEALKERFINRQKSK	295
MRSA252_vWbp	-----	
MW2_vWbp	-----	
Newman_vWbp	KTPVVSLEYDFEHKQRIDNENDKKLVVSAPTCKPTSPTTYTETTTQVPMPTVERQTQQQI	358
USA300_vWbp	KTPVVSLEYDFEHKQRIDNENDKKLVVSAPTCKPTSPTTYTETTTQVPMPTVERQTQQQI	358
N315_vWbp	NESVVSLLIDDED-----DNENDRQLVVSAPSCKPTTPTTYTETTTQVPMPTVERQTQQQI	350
MRSA252_vWbp	-----	
MW2_vWbp	-----	
Newman_vWbp	IYNAPKQLAGLNGESHDFTTTHQSPTTSNHTHNNVVEFEETSALPGRKSGSLVGISQIDS	418
USA300_vWbp	IYNAPKQLAGLNGESHDFTTTHQSPTTSNHTHNNVVEFEETSALPGRKSGSLVGISQIDS	418
N315_vWbp	VYKTPKPLAGLNGESHDFTTTHQSPTTSNHTHNNVVEFEETSALPGRKSGSLVGISQIDS	410
MRSA252_vWbp	-----	
MW2_vWbp	-----	
Newman_vWbp	SHLTEREKRVIKREHVREAQKLVDNYKDTHSYKDRINAQQKVNTLSEGHQKRFNKQINKV	478
USA300_vWbp	SHLTEREKRVIKREHVREAQKLVDNYKDTHSYKDRINAQQKVNTLSEGHQKRFNKQINKV	478
N315_vWbp	SHLTEREKRVIKREHVREAQKLVDNYKDTHSYKDRINAQQKVNTLSEGHQKRFNKQINKV	470
MRSA252_vWbp	-----	
MW2_vWbp	----	
Newman_vWbp	YNGK 482	
USA300_vWbp	YNGK 482	
N315_vWbp	YNGK 474	
MRSA252_vWbp	----	

FIG. 9B

ES 2 806 945 T3

USA300_vWbp	VVSGEKNPYVSESLEKLTNNKNKSRTVEEYKKSLLDLIWSFPNLDNERFDNPEYKEAMKKY	60
Newman_vWbp	VVSGEKNPYVSESLEKLTNNKNKSRTVEEYKKSLLDLIWSFPNLDNERFDNPEYKEAMKKY	60
N315_vWbp	VVSGEKNPYVSKALELKDKNKSNKSNYENYRDSLESLSLSSLFADYEKYEPEYKAVRKY *****:*.:.:..*:.: *:*:.**.* *.. * *:.:..*:.:*****	60
USA300_vWbp	QQRFMAEDEALKKFFSEEEKIKNGNTDN--LDYLGLSHERYESVFNTLTKQSEEFLEIE	118
Newman_vWbp	QQRFMAEDEALKKFFSEEEKIKNGNTDN---LDYLGLSHERYESVFNTLTKQSEEFLEIE	118
N315_vWbp	QQRFMAEDDALKNFLNEEEKIKNADISRKSNLLGLTHERYSYIFDTLKKNKQEFLEKDIE **:*:.*****:*.:.*****:.. : *:.*****:*.*****:..*****:*	12
USA300_vWbp	DIKKDNPELKDFNEEQKLCDELELNKLENQILMLGKTFYQNYRDDVESLYSKLDLIMGYK	178
Newman_vWbp	DIKKDNPELKDFNEEQKLCDELELNKLENQILMLGKTFYQNYRDDVESLYSKLDLIMGYK	178
N315_vWbp	EIQLKNSDLKDFNNTQHNADVEINNLENKVLVVGYYTFYNTNKDEVEELYSELDLIVGEV :*.:.*****: * *:.*****:*****:*** * *:.: *:.*****:*****:*	180
USA300_vWbp	DEERANKKAVNKRMLNKKEDLETIIDEFFSDIDKTRPNNIPVLEDEKQEEKNHKNMAQL	238
Newman_vWbp	DEERANKKAVNKRMLNKKEDLETIIDEFFSDIDKTRPNNIPVLEDEKQEEKNHKNMAQL	238
N315_vWbp	QDKSKDKRAVNQRMLNRKKEDLEFIIDKFPKKIQQERPEISIPALTSEKN--HNQTMALKL :.. : *:.*****:***** *****:*.:.: *:.*****: *:.: *:.: *	238
USA300_vWbp	KSDTEAAKSDESKRSKRSKRSLENTQNHKPAQEVSEQQKAEYDKRAEERKARFLDNQKIK	298
Newman_vWbp	KSDTEAAKSDESKRSKRSKRSLENTQNHKPAQEVSEQQKAEYDKRAEERKARFLDNQKIK	298
N315_vWbp	KADTEAAKNVSKRSKRS---LNTQNNKSTQEISEEQKAEYQRKSEALKERFINRQKSK *:.*****. * ***** *****:*.*****:*****: * *:.*****	295
USA300_vWbp	KTFVVSLEYDFEHKQRIDNENDKKLVVSAPTCKKPTSPPTYTETTTQVPMPTVERQTQQQI	358
Newman_vWbp	KTFVVSLEYDFEHKQRIDNENDKKLVVSAPTCKKPTSPPTYTETTTQVPMPTVERQTQQQI	358
N315_vWbp	NESVSLIDDED---DNENDRQLVVSAPSKKPTPTPTTETTTQVPMPTVERQTQQQI : *:.***** * : *****:*****:*****:*****:*****:*****	350
USA300_vWbp	IYNAPKQLAGLNGESHDFTTTHQSPTTNSNHTHNNVVEFEETSALPGRKSGSLVGISQIDS	418
Newman_vWbp	IYNAPKQLAGLNGESHDFTTTHQSPTTNSNHTHNNVVEFEETSALPGRKSGSLVGISQIDS	418
N315_vWbp	VYKTPKPLAGLNGESHDFTTTHQSPTTNSNHTHNNVVEFEETSALPGRKSGSLVGISQIDS :*.:. * *****:*****:*****:*****:*****:*****	410
USA300_vWbp	SHLTEREKRVIKREHVREAQKLVLDNYKDTHSYKDRINAQQKVNTLSEGHQKRFNKQINKV	478
Newman_vWbp	SHLTEREKRVIKREHVREAQKLVLDNYKDTHSYKDRINAQQKVNTLSEGHQKRFNKQINKV	478
N315_vWbp	SHLTEREKRVIKREHVREAQKLVLDNYKDTHSYKDRINAQQKVNTLSEGHQKRFNKQINKV *****:*****:*****:*****:*****:*****	470
USA300_vWbp	YNGK 482	
Newman_vWbp	YNGK 482	
N315_vWbp	YNGK 474 ****	

FIG. 9C