República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112012009014-3 A2

(22) Data do Depósito: 30/09/2010

(43) Data da Publicação Nacional: 18/08/2020

(54) Título: CONJUGAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS STAPHYLOCOCCUS AUREUS TIPO 5 E TIPO 8

(51) Int. Cl.: A61K 47/48.

(30) Prioridade Unionista: 30/09/2009 US 61/247,518.

(71) Depositante(es): NOVARTIS AG.

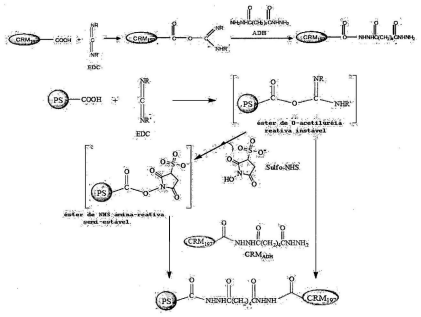
(72) Inventor(es): FRANCESCO BERTI; PAOLO COSTANTINO; MARIA RASORIA ROMANO.

(86) Pedido PCT: PCT IB2010002565 de 30/09/2010

(87) Publicação PCT: WO 2011/138636 de 10/11/2011

(85) Data da Fase Nacional: 30/03/2012

(57) Resumo: CONJUGAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS CAPSULARES DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS DO TIPO 5 E TIPO 8 A invenção fornece um processo para a preparação de um conjugado de um polissacarídeo capsular de S. aureus do tipo 5 ou tipo 8 e uma molécula de transporte, que compreende as etapas de: (a) despolimerização do polissacarídeo capsular, para gerar um fragmento de polissacarídeo; (b) oxidação do fragmento a fim de introduzir um grupo aldeído em pelo menos um resíduo sacarídico no fragmento, para gerar um resíduo sacarídico oxidado; e (C) acoplamento do resíduo sacarídico oxidado a uma molécula de transporte por meio do grupo aldeído, gerando, dessa forma, o conjugado. O acoplamento na etapa (c) pode ser direto, ou pode ser por meio de uma molécula vinculadora. A invenção também fornece um conjugado obtido ou passível de obtenção por esse processo.



CONJUGAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS CAPSULARES DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* DO TIPO 5 E TIPO 8

CAMPO TÉCNICO

Esta invenção está no campo de conjugação de sacarídeos capsulares bacterianos, particularmente polissacarídeos capsulares de *Staphylococcus aureus* tipo 5 ou tipo 8, um veículos a fim de formar glicoconjugados. Os glicoconjugados são úteis para imunização.

FUNDAMENTOS DA TÉCNICA

Os sacarídeos capsulares de bactérias têm sido usados por muitos anos em vacinas contra bactérias capsuladas. No entanto, como sacarídeos são antígenos T-independentes, eles são pouco imunogênicos. A conjugação a um veículo pode converter antígenos T-independentes em antígenos T-dependentes, aumentando, dessa forma, respostas de memória e permitindo que a imunidade protetora se desenvolva. As vacinas de sacarídeo mais eficazes são, portanto, baseadas em glicoconjugados, e um protótipo de vacina conjugada foi contra *Haemophilus influenzae* tipo b ("Hib") [por exemplo, veja o capítulo 14 da referência 97].

Outra bactéria para a qual foram desenvolvidas vacinas conjugadas é *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Vários polissacarídeos foram isolados de *S. aureus* para uso em glicoconjugados. Dois polissacarídeos de interesse particular são polissacarídeos capsulares do tipo 5 e do tipo 8. Aproximadamente 60% das cepas de *S. aureus* humano são tipo 8 e aproximadamente 30% são do tipo 5. Muito do trabalho dos conjugados do tipo 5 e tipo 8 foi realizado por Fattom *e cols.*, e está descrito em documentos como, por exemplo, referências 1 a 9. O processo de Fattom para

conjugação de polissacarídeos do tipo 5 e tipo 8 tipicamente envolve tiolação de um polissacarídeo purificado usando cistamina. A reação se baseia na presença de grupos carboxilato no polissacarídeo capsular. Esses grupos reagem com cistamina na presença de uma carbodiimida, por exemplo, EDAC. O polissacarídeo derivatizado é então conjugado a uma proteína de transporte como, por exemplo, a endotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* (ETA), tipicamente por meio de um vinculador [2]. Outros pesquisadores realizaram conjugação de polissacarídeos capsulares do tipo 5 e do tipo 8 purificados por aminação redutiva [10 e 11]; acoplamento de glutaraldeído [10]; ou reação de grupos hidroxil nos polissacarídeos com agentes de cianilação como, por exemplo, CDAP [12] ou tricloreto cianúrico [13].

Embora tendo sido demonstrado que as vacinas conjugadas preparadas pelo processo de Fattom são seguras e imunogênicas em humanos [5], permanece a necessidade de formas adicionais e melhores de preparar conjugados de polissacarídeos capsulares de *S. aureus* tipo 5 ou tipo 8.

REVELAÇÃO DA INVENÇÃO

A invenção é baseada em um método de conjugação que pode ser usado no lugar dos métodos de conjugação revelados na técnica estabelecida. Diferentemente desses métodos, o método da invenção não envolve conjugação por meio de grupos hidroxil ou carboxilato no polissacarídeo. O método, portanto, deixa esses grupos em uma forma que é mais próxima à forma observada no polissacarídeo nativo do que a da técnica estabelecida. Em vez de usar esses grupos, o método envolve a geração de grupos aldeído reativos no

polissacarídeo para uso na conjugação. Os conjugados resultantes podem ter propriedades imunológicas diferentes, preferivelmente aprimoradas, comparados com os conjugados da técnica estabelecida.

A invenção, portanto, fornece métodos alternativos ou aprimorados para conjugação de um polissacarídeo capsular de *S. aureus* tipo 5 ou tipo 8 a uma proteína de transporte e conjugados obtidos a partir dela. A invenção também fornece intermediários que são úteis nos métodos da invenção e métodos para a preparação desses intermediários.

Em um primeiro aspecto, a invenção fornece um processo para a preparação de um conjugado de um polissacarídeo capsular de *S. aureus* tipo 5 ou tipo 8 e uma molécula de transporte, que compreende as etapas de: (a) despolimerização do polissacarídeo capsular, para gerar um fragmento de polissacarídeo; (b) oxidação do fragmento a fim de introduzir um grupo aldeído em pelo menos um resíduo sacarídico no fragmento, para gerar um resíduo sacarídico oxidado; e (c) acoplamento do resíduo sacarídico oxidado a uma molécula de transporte por meio do grupo aldeído, gerando, dessa forma, o conjugado. O acoplamento na etapa (c) pode ser direto, ou pode ser por meio de uma molécula vinculadora. A invenção também fornece um conjugado obtido ou passível de obtenção por esse processo.

O polissacarídeo capsular

A invenção se baseia nos polissacarídeos capsulares de *S. aureus* tipo 5 e tipo 8. As estruturas de polissacarídeos capsulares do tipo 5 e do tipo 8 foram descritas nas referências 14 e 15 como:

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)-α-L-FucNAc(1→3)-β-D-FucNAc-(1 →

Dados recentes de espectroscopia por RNM [16] levaram a uma revisão dessas estruturas 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 →

O polissacarídeo pode ser modificado quimicamente em relação ao polissacarídeo capsular encontrado na natureza. Por exemplo, o polissacarídeo pode ser des-O-acetilado (parcial ou totalmente), des-N-acetilado (parcial ou totalmente), N-propionado (parcial ou totalmente) etc. A desacetilação pode ocorrer antes, durante ou depois da conjugação, mas tipicamente ocorre antes da conjugação. Dependendo do polissacarídeo particular, a desacetilação pode ou não afetar a imunogenicidade; por exemplo, a vacina NeisVac C™ usa um polissacarídeo des-O-acetilado, enquanto Menjugate™ é acetilado, mas ambas as vacinas são eficazes. O efeito da desacetilação etc. pode ser avaliado por ensaios de rotina. Por exemplo, a relevância da O-acetilação em polissacarídeos capsulares de *S. aureus* tipo 5 ou tipo 8 é discutida na referência 6. Os polissacarídeos nativos são considerados neste documento como tendo 75% de O-acetilação. Esses polissacarídeos induziram anticorpos tanto para o arcabouço do polissacarídeo quanto para os

grupos O-acetil. Polissacarídeos com 0% de O-acetilação ainda despertam anticorpos para o arcabouço do polissacarídeo. Ambos os tipos de anticorpos eram opsônicos contra cepas de *S. aureus* que variavam em seu teor de O-acetil. Conseqüentemente, os polissacarídeos capsulares do tipo 5 ou do tipo 8 usados na presente invenção podem ter entre 0 e 100% de O-acetilação. Por exemplo, o grau de O-acetilação do polissacarídeo capsular do tipo 5 pode ser de 10-100%, 10-100%, 20-100%, 30-100%, 40-100%, 50-100%, 60-100%, 70-100%, 80-100%, 90-100%, 50-90%, 60-90%, 70-90% ou 80-90%. Alternativamente, pode ser usado 0% de polissacarídeo capsular do tipo 5 O-acetilado. Similarmente, o grau de O acetilação do polissacarídeo capsular do tipo 8 pode ser de 10-100%, 10-100%, 20-100%, 30-100%, 40-100%, 50-100%, 60-100%, 70-100%, 80-100%, 90-100%, 50-90%, 60-90%, 70-90% ou 80-90%. Alternativamente, pode ser usado 0% de polissacarídeo capsular do tipo 8 O-acetilado. Em uma modalidade, o grau de O-acetilação dos polissacarídeos capsulares do tipo 5 e do tipo 8 pode ser de 10-100%, 20-100%, 30-100%, 40-100%, 50-100%, 60-100%, 70-100%, 80-100%, 90-100%, 50-90%, 60-90%, 70-90% ou 80-90%. Em outras modalidades, são usados 0% de polissacarídeos capsulares do tipo 5 e do tipo 8 O-acetilados. O grau de N-acetilação do polissacarídeo capsular do tipo 5 usado na invenção pode ser de 0-100%, 50-100%, 75-100%, 80-100%, 90-100% ou 95-100%. Tipicamente, o grau de N-acetilação do polissacarídeo capsular do tipo 5 é de 100%. Similarmente, o grau de N-acetilação do polissacarídeo capsular do tipo 8 usado na invenção pode ser de 0-100%, 50-100%, 75-100%, 80-100%, 90-100% ou 95-

100%. Tipicamente, o grau de N-acetilação do polissacarídeo capsular do tipo 8 é de 100%. Em uma modalidade, o grau de N-acetilação dos polissacarídeos capsulares do tipo 5 e do tipo 8 pode ser de 0-100%, 50-100%, 75-100%, 80-100%, 90-100% ou 95-100%. Tipicamente, o grau de N-acetilação do polissacarídeo capsular do tipo 5 e do tipo 8 é de 100%.

O grau de O-acetilação do polissacarídeo pode ser determinado por qualquer método conhecido na técnica, por exemplo, por RNM de próton (por exemplo, como descrito nas referências 17, 18, 19 ou 20). Um método adicional é descrito na referência 21. Métodos similares podem ser usados para determinar o grau de N-acetilação do polissacarídeo. Grupos O-acetil podem ser removidos por hidrólise, por exemplo, por tratamento com uma base como, por exemplo, hidrazina anidra [22] ou NaOH [6]. Métodos similares podem ser usados para remover grupos N-acetil. Para manter níveis elevados de O-acetilação em polissacarídeos capsulares do tipo 5 e/ou 8, tratamentos que levam à hidrólise dos grupos O-acetil são minimizados, por exemplo, tratamentos em extremos de pH.

Os polissacarídeos capsulares podem ser purificados por técnicas conhecidas, como descrito nas referências aqui citadas. Um processo típico envolve inativação com fenol-etanol de células de *S. aureus*, centrifugação, tratamento com lisostafina, tratamento com RNase/DNase, centrifugação, diálise, tratamento com protease, diálise adicional, filtração, precipitação com etanol/$CaCl_2$, diálise, liofilização, cromatografia de troca aniônica, diálise, liofilização, cromatografia de exclusão de tamanho, diálise e liofilização [1]. Um processo alternativo envolve a

autoclavagem de células de *S. aureus*, ultrafiltração do sobrenadante contendo polissacarídeo, concentração, liofilização, tratamento com metaperiodato de sódio para remover ácido teicóico, ultrafiltração adicional, diafiltração, cromatografia líquida de exclusão de tamanho de alto desempenho, diálise e liofilização [23]. De preferência, é usado o processo de purificação descrito na referência 24.

No entanto, a invenção não está limitada aos polissacarídeos purificados de fontes naturais, e os polissacarídeos podem ser obtidos por outros métodos, por exemplo, síntese total ou parcial.

A molécula de transporte

A invenção envolve o uso de moléculas de transporte, que são tipicamente proteínas. Em geral, a conjugação covalente de sacarídeos a veículos aumenta a imunogenicidade de sacarídeos, na medida em que os converte de antígenos T-independentes em antígenos T-dependentes, permitindo, dessa forma, a sensibilização para memória imunológica. A conjugação é particularmente útil para vacinas pediátricas [por exemplo, referência 25] e é uma técnica bem conhecida [por exemplo, revisado nas referências 26 a 34].

Proteínas de transporte preferidas são toxinas bacterianas, por exemplo, toxinas da difteria ou tétano, ou toxóides ou mutantes destes. Os inventores verificaram que o mutante da toxina diftérica CRM197 [35] é adequado. A exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* (ETA) e seu mutante atóxico, a exoproteína recombinante A (rEPA), têm sido usados como proteínas de transporte para polissacarídeos

capsulares de *S. aureus* tipo 5 ou tipo 8 ([1] e [2]). A α-hemolisina de *S. aureus* (α-toxina) ([10] e [36]), ovalbumina [13] e albumina sérica humana [11] também têm sido usadas. Esses veículos podem ser usados na presente invenção.

Outras proteínas de transporte adequadas incluem o complexo de proteína da membrana externa de *N. meningitidis* [37], peptídeos sintéticos [38, 39], proteínas de choque térmico [41, 41], proteínas de pertussis [42, 43], citocinas [44], linfocinas [44], hormônios [44], fatores de crescimento [44], albumina sérica humana (tipicamente recombinante), proteínas artificiais que compreendem múltiplos epitopos de célula T $CD4^+$ humana de vários antígenos derivados de patógeno [45], por exemplo, N19 [46], proteína D de *H. influenzae* [47-49], proteína da superfície pneumocócica PspA [50], pneumolisina [51] ou seus derivados atóxicos [52], proteínas de captação de ferro [53], toxina A ou B de *C. difficile* [54], uma proteína de GBS [55], uma proteína de GAS [56] etc.

Outras proteínas de transporte adequadas incluem antígenos protéicos de *S. aureus*, por exemplo, os antígenos protéicos de *S. aureus* apresentados abaixo.

É possível usar mais de uma proteína de transporte, por exemplo, para reduzir o risco de supressão do veículo. Dessa forma, diferentes proteínas de transporte podem ser usadas para os polissacarídeos capsulares do tipo 5 e do tipo 8, por exemplo, o polissacarídeo do tipo 5 pode ser conjugado a CRM197, enquanto o polissacarídeo do tipo 8 pode ser conjugado a rEPA. Também é possível usar mais de uma proteína de transporte para um antígeno polissacarídico

particular, por exemplo, o polissacarídeo do tipo 5 pode estar em dois grupos, com um grupo conjugado a CRM197 e o outro conjugado a rEPA. Tipicamente, no entanto, a mesma proteína de transporte é usada para todos os polissacarídeos.

Uma única proteína de transporte pode carregar mais de um antígeno polissacarídico [57, 58]. Por exemplo, uma única proteína de transporte pode ter a ela conjugados polissacarídeos capsulares do tipo 5 e do tipo 8. Para atingir esse objetivo, diferentes polissacarídeos podem ser misturados antes do processo de conjugação. Tipicamente, no entanto, há conjugados separados para cada polissacarídeo, com os diferentes polissacarídeos sendo misturados após a conjugação. Os conjugados separados podem ser baseados no mesmo veículo.

Despolimerização

Na etapa (a) do processo da invenção, o polissacarídeo capsular é despolimerizado para gerar um fragmento de polissacarídeo. A Despolimerização do polissacarídeo capsular do tipo 8 por sonificação antes da conjugação foi relatada [3]. Os autores concluíram que polissacarídeo do tipo 8 de baixo peso molecular não era imunogênico. Embora esses autores, portanto, tenham favorecido polissacarídeos de peso molecular elevado, a presente invenção surpreendentemente se utiliza de fragmentos de polissacarídeo com um peso molecular menor do que polissacarídeos capsulares nativos.

Polissacarídeos de comprimento total podem ser despolimerizados para gerar fragmentos mais curtos para uso na invenção por vários métodos. Os inventores verificaram

que métodos que resultam na clivagem de (1→3) ligações glicosídicas entre os resíduos α-L-FucNAc(3OAc) e β-D-FucNAc no polissacarídeo capsular do tipo 5 são particularmente adequados. Quando esses métodos são aplicados ao polissacarídeo capsular do tipo 5, eles resultam em um fragmento de polissacarídeo que possui uma porção β-D-FucNAc-(1→ em seu terminal não redutor. Essa porção inclui dois grupos hidroxil vizinhos. Similarmente, quando esses métodos são aplicados ao polissacarídeo capsular do tipo 8, acredita-se que resultem em um fragmento de polissacarídeo que possui uma porção α-D-FucNAc-(1→ em seu terminal não redutor, cuja porção também inclui dois grupos hidroxil vizinhos. Os grupos hidroxil vizinhos no fragmento de polissacarídeo do tipo 5 ou do tipo 8 fornecem um ponto de manipulação para subseqüente conjugação do fragmento a uma molécula de transporte, como descrito abaixo.

Conseqüentemente, em um aspecto adicional, a invenção fornece um processo para o tratamento de um polissacarídeo capsular *S. aureus* do tipo 5, que compreende a etapa de despolimerização do polissacarídeo capsular, para gerar um fragmento de polissacarídeo que possui uma porção β-D-FucNAc-(1→ em seu terminal não redutor. Em um aspecto relacionado, a invenção fornece um processo para o tratamento de um polissacarídeo capsular de *S. aureus* do tipo 8, que compreende a etapa de despolimerização do polissacarídeo capsular, para gerar um fragmento de polissacarídeo que possui uma porção α-D-FucNAc-(1→ em seu terminal não redutor. O polissacarídeo capsular pode ser um polissacarídeo capsular de *S. aureus* tipo 5 ou tipo 8 como

descrito na seção "O polissacarídeo capsular" acima. A invenção também fornece um fragmento de polissacarídeo obtido ou passível de obtenção por um desses processos.

Os inventores verificaram que a despolimerização pode ser realizada por hidrólise ácida. Para hidrólise ácida, prefere-se usar um ácido leve, por exemplo, ácido acético, para evitar reações colaterais em outros grupos dentro do polissacarídeo. Aqueles habilitados na técnica seriam capazes de identificar ácidos e condições adequados (por exemplo, de concentração, temperatura e/ou tempo) para hidrólise. Por exemplo, os inventores verificaram que o tratamento do polissacarídeo a 2 mg/ml com ácido acético 2% (v/v) a 90°C por 3 horas é adequado. Os inventores também verificaram que o tratamento a 2 mg/ml com ácido acético 5% a 90°C por 30 minutos, 5 ou 6 horas é adequado. O tratamento com outros ácidos, por exemplo, ácido trifluoracético ou outros ácidos orgânicos, também pode ser adequado. Em particular, os inventores verificaram que a eficiência de despolimerização pode ser aumentada, particularmente para o polissacarídeo capsular do tipo 8, por utilização de ácido clorídrico. Por exemplo, os inventores verificaram que o tratamento de polissacarídeo com 2 M de ácido clorídrico a 100°C por 30 minutos é adequado. Os inventores também verificaram que o tratamento com 2 M de ácido clorídrico a 100°C por 1, 1,5, 2 ou 2,5 horas é adequado. Esse tratamento com ácido clorídrico pode resultar na des-O-acetilação do polissacarídeo, por exemplo, como descrito abaixo.

Outros métodos para despolimerização do polissacarídeo podem ser adequados. Esses métodos incluem aquecimento,

microfluidificação [59], radiação sônica [3], oxidação-redução [60] ou ozonólise [61].

Os fragmentos de polissacarídeo podem ser identificados por cromatografia, por exemplo, cromatografia de exclusão de tamanho. Massas moleculares específicas podem ser medidas por filtração em gel em relação a padrões de pululana como, por exemplo, aqueles disponíveis por Polymer Standard Service [62]. Tipicamente, o fragmento da invenção é uma mistura de fragmentos com massas dentro de uma faixa de valores. Para o polissacarídeo capsular do tipo 5 despolimerizado, a massa molecular do fragmento tipicamente varia entre 1.500 kDa, por exemplo, entre 5 e 100 kDa, particularmente entre 10 e 50 kDa e, mais particularmente, entre 20 e 30 kDa. Similarmente, para o polissacarídeo capsular do tipo 8 despolimerizado, a massa molecular do fragmento pode variar entre 1.500 kDa, por exemplo, entre 5 e 100 kDa, particularmente entre 10 e 50 kDa e, mais particularmente, entre 20 e 30 kDa. Em algumas modalidades, fragmentos de polissacarídeo do tipo 5 e/ou do tipo 8 de baixo peso molecular são selecionados para uso na invenção. Por exemplo, as frações de filtração em gel que correspondem a fragmentos de baixo peso molecular podem ser selecionadas e reunidas em um pool. Os fragmentos de polissacarídeo de baixo peso molecular tipicamente possuem uma massa molecular que varia entre 5 e 20 kDa.

A despolimerização pode resultar em uma alteração no grau de O-acetilação do polissacarídeo capsular. Por exemplo, os inventores verificaram que a hidrólise ácida pode resultar em uma diminuição no grau de O-acetilação. Em algumas modalidades, o grau de O-acetilação do fragmento

pode ser de 10-90%, 20-70%, 30-50%, particularmente 35-45%. Em outras modalidades, o grau de O-acetilação do fragmento pode ser de 0-10%, 0-5%, 0-2%, particularmente 0%.

Introdução de um grupo aldeído

Na etapa (b) do processo, o fragmento é oxidado a fim de introduzir um grupo aldeído em pelo menos um resíduo sacarídico no fragmento. Essa etapa pode envolver a introdução de mais de um grupo aldeído no resíduo sacarídico. Em particular, dois grupos aldeído podem ser introduzidos. Por exemplo, quando a despolimerização na etapa (a) resulta em um fragmento de polissacarídeo do tipo 5 que possui uma porção β-D-FucNAc-(1→ em seu terminal não redutor, os dois grupos hidroxil vizinhos nessa porção podem ser oxidados a fim de introduzir dois grupos aldeído na porção. Dessa forma, a porção β-D-FucNAc-(1→ pode ser o resíduo sacarídico da etapa (b). Similarmente, quando a despolimerização resulta em um fragmento de polissacarídeo do tipo 8 que possui uma porção α-D-FucNAc-(1→ em seu terminal não redutor, os dois grupos hidroxil vizinhos nessa porção podem ser oxidados para introduzir dois grupos aldeído. Dessa forma, a porção α-D-FucNAc-(1→ pode ser o resíduo sacarídico da etapa (b).

Conseqüentemente, em um aspecto adicional, a invenção fornece um processo para o fornecimento de um derivado de polissacarídeo capsular de *S. aureus* do tipo 5, que compreende a etapa de oxidação de um polissacarídeo capsular de *S. aureus* do tipo 5 que possui uma porção β-D-FucNAc-(1→ em seu terminal não redutor para converter dois grupos hidroxil vizinhos na porção β-D-FucNAc-(1→ em dois grupos aldeído. Em um aspecto relacionado, a invenção

fornece um processo para o fornecimento de um derivado de polissacarídeo capsular de *S. aureus* do tipo 8, que compreende a etapa de oxidação de um polissacarídeo capsular de *S. aureus* do tipo 8 que possui uma porção α-D-FucNAc-(1→ em seu terminal não redutor para converter dois grupos hidroxil vizinhos na porção α-D-FucNAc-(1→ em dois grupos aldeído. O polissacarídeo capsular pode ser um fragmento de polissacarídeo como descrito na seção "Despolimerização" acima. A invenção também fornece um derivado de polissacarídeo capsular de *S. aureus* obtido ou passível de obtenção por um desses processos.

Reações típicas para produzir aldeídos incluem o uso de sais de periodato, e particularmente metaperiodatos (por exemplo, metaperiodato de sódio ou potássio, por exemplo, $NaIO_4$), para oxidar grupos hidroxil vizinhos [63]. Aqueles habilitados na técnica seriam capazes de identificar condições adequadas para oxidação. Por exemplo, os inventores verificaram que o tratamento de polissacarídeo a 2 mg/ml com $NaIO_4$ em uma proporção de 1:1 (p/p) em temperatura ambiente por 1-2 horas no escuro é adequado. Os inventores também verificaram que o tratamento de polissacarídeo a 2 mg/ml com 93 mM de $NaIO_4$ em temperatura ambiente por 8 horas no escuro é adequado. Outras condições de oxidação podem ser usadas, por exemplo, o uso de tetróxido de ósmio etc.

Acoplamento da uma molécula de transporte

O acoplamento do resíduo sacarídico oxidado à molécula de transporte na etapa (c) do processo pode ser direto ou por meio de um vinculador. Qualquer reação de conjugação adequada pode ser usada, com qualquer vinculador adequado,

se desejado.

Quando a oxidação na etapa (b) resulta em um fragmento de polissacarídeo do tipo 5 que possui uma porção β-D-FucNAc-(1→ em seu terminal não redutor na qual dois grupos aldeído foram introduzidos na porção, o acoplamento na etapa (c) pode ser por meio de um desses grupos aldeído. Dessa forma, a porção β-D-FucNAc-(1→ oxidada pode ser o resíduo sacarídico oxidado da etapa (c). Similarmente, quando a oxidação resulta em um fragmento de polissacarídeo do tipo 8 que possui uma porção α-D-FucNAc-(1→ em seu terminal não redutor na qual dois grupos aldeído foram introduzidos na porção, o acoplamento na etapa (c) pode ser por meio de um desses grupos aldeído. Dessa forma, a porção α-D-FucNAc-(1→ oxidada pode ser o resíduo sacarídico oxidado da etapa (c).

Conseqüentemente, em um aspecto adicional, a invenção fornece um processo para o fornecimento de um polissacarídeo capsular de *S. aureus* do tipo 5 conjugado, que compreende a etapa de acoplamento a uma molécula de transporte de um polissacarídeo capsular de *S. aureus* do tipo 5 que possui uma porção β-D-FucNAc-(1→ em seu terminal não redutor que foi oxidada para converter dois grupos hidroxil vizinhos em dois grupos aldeído, em que o acoplamento é por meio de um dos grupos aldeído. Em um aspecto relacionado, a invenção fornece um processo para o fornecimento de um polissacarídeo capsular de *S. aureus* do tipo 8 conjugado, que compreende a etapa de acoplamento a uma molécula de transporte de um polissacarídeo capsular de *S. aureus* do tipo 8 que possui uma porção α-D-FucNAc-(1→ em seu terminal não redutor que foi oxidada para converter

dois grupos hidroxil vizinhos em dois grupos aldeído, em que o acoplamento é por meio de um dos grupos aldeído. O polissacarídeo capsular pode ser um polissacarídeo capsular como descrito na seção "Introdução de um grupo aldeído" acima. A molécula de transporte pode ser um veículo, como descrito na seção "A molécula de transporte" acima. A invenção também fornece um polissacarídeo capsular conjugado obtido ou passível de obtenção por um desses processos.

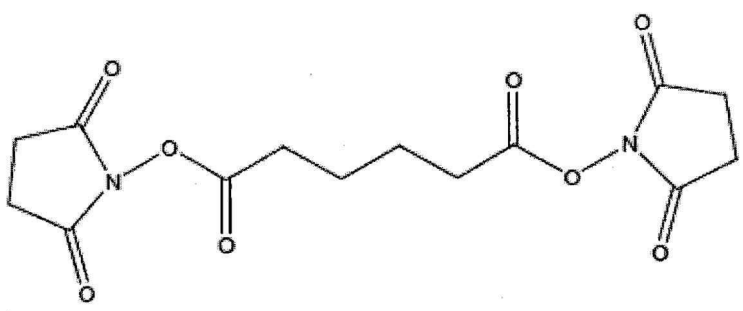
A adesão do resíduo sacarídico oxidado ou vinculador ao veículo é tipicamente por meio de um grupo amina ($-NH_2$), por exemplo, na cadeia lateral de um resíduo de lisina em uma proteína de transporte, ou de um resíduo de arginina. A adesão ao veículo também pode ser por meio de um grupo sulfidrila (-SH), por exemplo, na cadeia lateral de um resíduo de cisteína. Os inventores verificaram que o acoplamento direto pode ser convenientemente obtido por reação de um grupo aldeído no resíduo sacarídico oxidado com um grupo amina no veículo por aminação redutiva. O acoplamento direto dessa natureza é, portanto, preferido na presente invenção. Em contraste, a referência 2 sugere que vinculadores podem ser vantajosos em conjugados de *S. aureus* do tipo 5 e 8. Se desejado, o acoplamento por meio de um vinculador pode ser usado na presente invenção, por exemplo, por reação de um grupo aldeído no resíduo sacarídico oxidado com um grupo amina no vinculador por aminação redutiva, ou por conversão do grupo aldeído em um grupo amina por aminação redutiva para fornecer um grupo amina para adesão do vinculador.

A aminação redutiva é uma técnica-padrão em química

orgânica, e foi usada intensamente na produção de conjugados de polissacarídeos capsulares para uso em vacinas, incluindo polissacarídeos capsulares de *S. aureus* [10]. Em uma modalidade, um grupo aldeído no resíduo sacarídico oxidado reage com um grupo amina no veículo ou vinculador. Isso pode ser convenientemente obtido por combinação do polissacarídeo com o veículo ou vinculador na presença de um agente redutor apropriado (por exemplo, cianoborohidretos, por exemplo, cianoborohidreto de sódio $NaBH_3CN$; borano-piridina; triacetoxiborohidreto de sódio; resina de troca de borohidreto; etc.). Em outra modalidade, um grupo aldeído é convertido em um grupo amina por aminação redutiva para fornecer um grupo amina para adesão do vinculador. A aminação redutiva envolve amônia ou uma amina primária (NH_2R). Isso pode ser convenientemente obtido por utilização de sal de amônio (por exemplo, cloreto de amônio) em combinação com um agente redutor apropriado (por exemplo, como listado acima). Aqueles habilitados na técnica seriam capazes de identificar condições adequadas para aminação redutiva. Por exemplo, os inventores verificaram que o tratamento de polissacarídeo a 10 mg/ml com proteína de transporte em uma proporção de 4:1 de polissacarídeo:proteína (p/p) e $NaBH_3CN$ em uma proporção de 2:1 de polissacarídeo:$NaBH_3CN$ é adequado.

O acoplamento por meio de um grupo vinculador pode ser feito usando qualquer procedimento conhecido, por exemplo, os procedimentos de aminação redutiva descritos acima. Em uma modalidade, um vinculador bifuncional pode ser usado para fornecer um primeiro grupo para acoplamento ao grupo aldeído no resíduo sacarídico oxidado e um segundo grupo

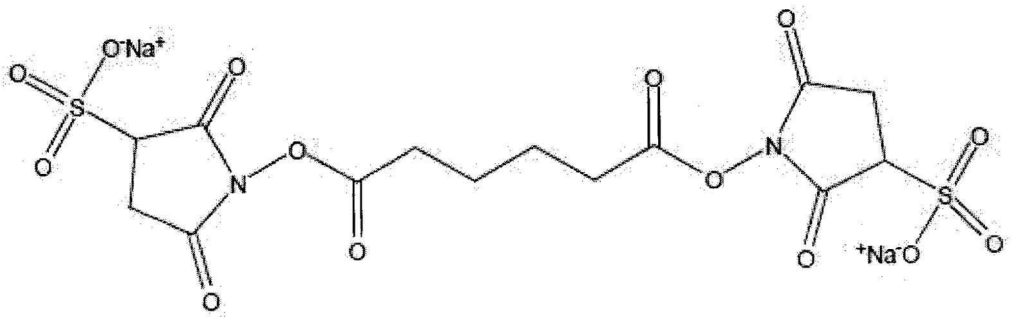
para acoplamento ao veículo. Por exemplo, um vinculador bifuncional da fórmula X_1-L-X_2 pode ser usado, em que X_1 pode reagir com o aldeído; X_2 pode reagir com o veículo; e L é uma porção de ligação no vinculador. Um grupo X_1 típico é um grupo amina. Grupos L típicos são alquis de cadeia linear com 1 a 10 átomos de carbono (por exemplo, C_1, C_2, C_3, C_4, C_5, C_6, C_7, C_8, C_9, C_{10}), por exemplo, $(CH_2)_4$ ou $(CH_2)_3$. Em outra modalidade, um vinculador bifuncional pode ser usado para fornecer um primeiro grupo para acoplamento a um grupo amina derivado do grupo aldeído no resíduo sacarídico oxidado (por exemplo, por aminação redutiva como descrito acima) e um segundo grupo para acoplamento ao veículo (tipicamente para acoplamento a uma amina no veículo). Por exemplo, um vinculador homobifuncional da fórmula X-L-X pode ser usado, em que os dois grupos X são iguais e podem reagir com as aminas; e em que L é uma porção de ligação no vinculador. Um grupo X típico é N-óxi-succinimida. L tipicamente possui a fórmula L'-L_2-L', em que L' é carbonil. Grupos L_2 típicos são alquis de cadeia linear com 1 a 10 átomos de carbono (por exemplo, C_1, C_2, C_3, C_4, C_5, C_6, C_7, C_8, C_9, C_{10}), por exemplo, $(CH_2)_4$. Um vinculador típico é, dessa forma, ácido adípico N-hidroxissuccinimida diéster (SIDEA):



Outros grupos X são aqueles que formam ésteres quando

combinados com HO-L-OH, por exemplo, norborano, ácido p-nitrobenzóico e sulfo-N-hidroxissuccinimida. Vinculadores bifuncionais reativos com aminas adicionais para uso com a invenção incluem acriloil haletos (por exemplo, cloreto) [65], haloacilhaletos [66], dissuccinimidil glutarato, dissuccinimidil suberato, etileno glicol bis[succinimidilsuccinato] etc.

O vinculador será geralmente adicionado em excesso molar em relação ao polissacarídeo. A reação do vinculador/polissacarídeo geralmente ocorrerá em um solvente aprótico (por exemplo, DMSO, acetato de etanol etc.), na medida em que os vinculadores são tipicamente insolúveis em água. Quando vinculadores hidrossolúveis são usados, no entanto, então uma ampla gama de solventes está disponível, incluindo solventes próticos como, por exemplo, água. Vinculadores adequados incluem formas sulfonadas, por exemplo, SIDEA sulfonado:



Quando um vinculador é usado, o conjugado compreenderá uma porção vinculadora. Essa porção não se origina no polissacarídeo nem no veículo, mas é uma terceira molécula usada durante a preparação do conjugado, e pode facilmente ser distinguida tanto do polissacarídeo quanto da proteína de transporte em um produto conjugado final. A porção vinculadora pode incluir átomos como, por exemplo, carbono,

hidrogênio, oxigênio e/ou nitrogênio. Vinculadores que compreendem carbono e hidrogênio são típicos, e vinculadores que ainda compreendem oxigênio e/ou nitrogênio também são tipicamente usados. Vinculadores que incluem átomos de nitrogênio podem incluir um átomo de carbono ligado a um átomo de nitrogênio, o qual, por sua vez, está ligado a um segundo átomo de carbono (-C-N-C-). Vinculadores que incluem um átomo de oxigênio tipicamente o incluem como parte de um grupo carbonil. Porções vinculadoras com um peso molecular entre 30-500 Da são típicas. Vinculadores que contêm dois grupos carbonil também são típicos.

Uma porção vinculadora particularmente útil é -NH-C(O)-$(CH_2)_n$-C(O)-, em que n é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10. O valor de n é tipicamente 4. O terminal -NH- nesse vinculador está normalmente anexado a um átomo de carbono da porção de polissacarídeo. O terminal -C(O)- está normalmente anexado a um átomo de nitrogênio em uma cadeia lateral de aminoácido no veículo. Uma porção vinculadora preferida pode convenientemente ser introduzida por um processo que envolve: aminação redutiva do aldeído no resíduo sacarídico oxidado; reação do grupo $-NH_2$ resultante com um vinculador bifuncional que é um diéster (por exemplo, um dissuccinimidil éster) de um ácido dióico (por exemplo, de ácido adípico, HOOC-$(CH_2)_4$-COOH); e aminação redutiva do produto (veja a Figura 6 [64]).

Outras químicas que podem ser usadas para anexar um vinculador a um grupo $-NH_2$ no polissacarídeo incluem:

- acroilação (por exemplo, por reação com acriloil cloreto), seguida por adição do tipo Michael ao ε-NH_2 de

uma cadeia lateral de aminoácido ou de um -SH de uma cadeia lateral de cisteína [65]. O vinculador resultante é -NH-C(O)-$(CH_2)_2$-(propionamido).

- reação com um haloacilhaleto, seguida por reação com o ε-NH_2 de uma cadeia lateral de aminoácido ou com um -SH de uma cadeia lateral de cisteína [66]. O vinculador é -NH-C(O)-CH_2-.

Conjugados com uma proporção de polissacarídeo: proteína (p/p) entre 1:20 (ou seja, proteína em excesso) e 20:1 (ou seja, polissacarídeo em excesso) são tipicamente produzidos pelo método da invenção. Proporções de 1:10 a 1:1 são preferidas, particularmente proporções entre 1:5 e 1:2 e, mais preferivelmente, cerca de 1:3. Em contraste, conjugados de polissacarídeo capsular do tipo 5 e do tipo 8 feitos por processos da técnica estabelecida tendem a ter proporções maiores, por exemplo, entre 0,73:1 e 1,08:1 nas referências 1, 2 e 3. Em modalidades particulares da invenção, a proporção de polissacarídeo:proteína (p/p) para o conjugado de polissacarídeo capsular do tipo 5 está entre 1:10 e 1:2; e/ou a proporção de polissacarídeo:proteína (p/p) para o conjugado de polissacarídeo capsular do tipo 8 está entre 1:5 e 7:10.

Composições podem incluir uma pequena quantidade de veículo livre [67]. Quando certa proteína de transporte está presente tanto em forma livre quanto em forma conjugada em uma composição da invenção, a forma não conjugada é preferivelmente no máximo 5% da quantidade total da proteína de transporte na composição como um todo e, mais preferivelmente, está presente em menos de 2% por peso.

Após conjugação, polissacarídeos livres e conjugados podem ser separados. Há muitos métodos adequados, incluindo cromatografia hidrofóbica, ultrafiltração tangencial, diafiltração etc. [veja também as referências 68 e 69 etc.].

Combinações de conjugados e outros antígenos

Além de fornecer conjugados individuais como descrito acima, a invenção fornece uma composição que compreende um conjugado da invenção e um ou mais antígenos adicionais. A composição é tipicamente uma composição imunogênica.

O(s) antígeno(s) adicional pode compreender conjugados adicionais da invenção e, portanto, a invenção fornece uma composição que compreende mais de um conjugado da invenção. Em particular, a presente invenção fornece uma composição que compreende um conjugado de polissacarídeo capsular do tipo 5 da invenção e um conjugado de polissacarídeo capsular do tipo 8 da invenção. Alternativamente, o(s) antígeno(s) adicional pode ser conjugados de polissacarídeo capsular do tipo 5 ou do tipo 8 preparados por métodos diferentes daqueles da invenção, por exemplo, os métodos das referências 1 a 13 acima. O(s) antígeno(s) adicional pode similarmente ser conjugados de polissacarídeo capsular do tipo 5 ou do tipo 8 preparados pelos métodos das referências 59, 70, 71, 72, 73 e 74 e, particularmente, os métodos exemplificados naqueles documentos. Conseqüentemente, a invenção fornece uma composição que compreende um conjugado de polissacarídeo capsular do tipo 5 e um polissacarídeo capsular do tipo 8 conjugado, em que um dos conjugados (o conjugado do tipo 5 ou o conjugado do tipo 8) é um conjugado da invenção e o outro conjugado não

é um conjugado da invenção.

O(s) antígeno(s) adicional pode compreender outros antígenos de *S. aureus*, incluindo antígenos protéicos e sacarídicos, mostrados abaixo.

O(s) antígeno(s) adicional pode compreender antígenos de patógenos diferentes de *S. aureus*. Dessa forma, as composições da invenção podem ainda compreender um ou mais antígenos diferentes de *S. aureus*, incluindo antígenos bacterianos, virais ou parasíticos adicionais. Estes podem ser selecionados entre os seguintes:

- um antígeno protéico de *N. meningitidis* sorogrupo B, tais como aqueles nas referências 75 a 81, com proteína "287" (veja abaixo) e derivados (por exemplo, "ΔG287") sendo particularmente úteis.

- uma preparação de vesícula da membrana externa (OMV) de *N. meningitidis* sorogrupo B, tais como aquelas reveladas nas referências 82, 83, 84, 85 etc.

- um antígeno sacarídico de *N. meningitidis* sorogrupo A, C, W135 e/ou Y, por exemplo, o oligossacarídeo revelado na referência 86 do sorogrupo C ou os oligossacarídeos da referência 87.

- um antígeno sacarídico de *Streptococcus pneumoniae* [por exemplo, referências 88-90; capítulos 22 e 23 da referência 97].

- um antígeno do vírus da hepatite A, por exemplo, vírus inativado [por exemplo, 91, 92; capítulo 15 da referência 97].

- um antígeno do vírus da hepatite B, por exemplo, os antígenos de superfície e/ou centrais [por exemplo, 92, 93; capítulo 16 da referência 97].

- um antígeno do vírus da hepatite C [por exemplo, 94].

- um antígeno de *Bordetella pertussis*, por exemplo, holotoxina de pertussis (PT) e hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente também em combinação com pertactina e/ou aglutinógenos 2 e 3 [por exemplo, referências 95 e 96; capítulo 21 da referência 97].

- um antígeno diftérico, por exemplo, um toxóide diftérico [por exemplo, capítulo 13 da referência 97].

- um antígeno tetânico, por exemplo, um toxóide tetânico [por exemplo, capítulo 27 da referência 97].

- um antígeno sacarídico de *Haemophilus influenzae* B [por exemplo, capítulo 14 da referência 97].

- um antígeno de *N. gonorrhoeae* [por exemplo, 75, 76, 77].

- um antígeno de *Chlamydia pneumoniae* [por exemplo, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104].

- um antígeno de *Chlamydia trachomatis* [por exemplo, 105].

- um antígeno de *Porphyromonas gingivalis* [por exemplo, 106].

- antígeno(s) da pólio [por exemplo, 107, 108; capítulo 24 da referência 97], por exemplo, IPV.

- antígeno(s) da raiva [por exemplo, 109], por exemplo, vírus inativado liofilizado [por exemplo, RabAvert™].

- antígenos do sarampo, caxumba e/ou rubéola [por exemplo, capítulos 19, 20 e 26 da referência 97].

- antígeno(s) de influenza [por exemplo, capítulos 17 e 18 da referência 97], por exemplo, as proteínas de

superfície hemaglutinina e/ou neuraminidase.

- um antígeno de *Moraxella catarrhalis* [por exemplo, 111].

- um antígeno de *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* grupo A) [por exemplo, 112, 113, 114].

- um antígeno de *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* grupo B) [por exemplo, 56, 115-117].

- um antígeno de *S. epidermidis* [por exemplo, polissacarídeo capsular tipo I, II e/ou III passíveis de obtenção das cepas ATCC-31432, SE-360 e SE-10, como descrito nas referências 118, 119 e 120].

Quando um antígeno de sacarídeo ou carboidrato é usado, ele tipicamente é conjugado a um veículo a fim de aumentar a imunogenicidade. A conjugação de antígenos sacarídicos de *H. influenzae* B, meningocócicos e pneumocócicos é bem conhecida.

Antígenos protéicos tóxicos podem ser detoxificados quando necessário (por exemplo, detoxificação de toxina de pertussis por meios químicos e/ou genéticos [96]).

Quando um antígeno diftérico é incluído na composição, é típico também incluir antígeno tetânico e antígenos de pertussis. Similarmente, quando um antígeno tetânico é incluído, é típico também incluir antígenos diftéricos e de pertussis. Similarmente, quando um antígeno de pertussis é incluído, é típico também incluir antígenos diftéricos e tetânicos.

Os antígenos podem ser adsorvidos a um sal de alumínio.

Um tipo de composição preferida inclui antígenos adicionais que afetam o paciente imunocomprometido e,

portanto, os conjugados de *S. aureus* da invenção podem ser combinados com um ou mais antígenos dos seguintes patógenos diferentes de *S. aureus*: *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus epidermis*, vírus influenza, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis* e vírus parainfluenza.

Outro tipo de composição preferida inclui antígenos adicionais de bactérias associadas a infecções hospitalares e, portanto, os conjugados de *S. aureus* da invenção podem ser combinados com um ou mais antígenos dos seguintes patógenos diferentes de *S. aureus*: *Clostridium difficile*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Candida albicans*; e *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal.

Os antígenos na composição tipicamente estarão presentes em uma concentração de pelo menos 1 µg/ml cada. Em geral, a concentração de certo antígeno será suficiente para despertar uma resposta imune contra aquele antígeno.

Como alternativa à utilização de antígenos protéicos na composição da invenção, pode ser usado um ácido nucléico que codifica o antígeno [por exemplo, referências 121 a 129]. Dessa forma, os componentes protéicos das composições da invenção podem ser substituídos por ácido nucléico (normalmente DNA, por exemplo, na forma de um plasmídeo) que codifica a proteína.

Em termos práticos, pode haver um limite superior quanto ao número de antígenos incluídos em composições da invenção. O número de antígenos (incluindo antígenos de *S. aureus*) em uma composição da invenção pode ser menos de 20, menos de 19, menos de 18, menos de 17, menos de 16, menos

de 15, menos de 14, menos de 13, menos de 12, menos de 11, menos de 10, menos de 9, menos de 8, menos de 7, menos de 6, menos de 5, menos de 4 ou menos de 3. O número de antígenos de *S. aureus* em uma composição da invenção pode ser menos de 6, menos de 5 ou menos de 4.

Composições farmacêuticas e métodos

A invenção fornece uma composição farmacêutica que compreende: (a) um conjugado da invenção e (b) um veículo farmaceuticamente aceitável. "Veículos farmaceuticamente aceitáveis" típicos incluem qualquer veículo que por si próprio não induza a produção de anticorpos danosos ao indivíduo que recebe a composição. Veículos adequados são tipicamente macromoléculas grandes, lentamente metabolizadas como, por exemplo, proteínas, polissacarídeos, ácidos poliláticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, sacarose [130], trehalose [131], lactose e agregados lipídicos (por exemplo, gotículas de óleo ou lipossomos). Esses veículos são bem conhecidos por aqueles habilitados na técnica. As vacinas também podem conter diluentes, por exemplo, água, solução salina, glicerol etc. Adicionalmente, substâncias auxiliares como, por exemplo, agentes umidificantes ou emulsificantes, substâncias para tamponamento do pH, e semelhantes, podem estar presentes. Soro fisiológico estéril, isento de pirógeno, tamponado com fosfato, é um veículo típico. Uma discussão detalhada de excipientes farmaceuticamente aceitáveis está disponível na referência 132.

As composições da invenção podem estar em forma aquosa (ou seja, soluções ou suspensões) ou em uma forma seca (por

exemplo, liofilizada). Se uma vacina seca é usada, então ela será reconstituída em um meio líquido antes da injeção. A liofilização de vacinas conjugadas é conhecida na técnica, por exemplo, o produto Menjugate™ é apresentado em forma liofilizada, enquanto NeisVac-C™ e Meningitec™ são apresentados em forma aquosa. Para estabilizar conjugados durante a liofilização, pode ser típico incluir um álcool de açúcar (por exemplo, manitol) ou um dissacarídeo (por exemplo, sacarose ou trehalose), por exemplo, entre 1 mg/ml e 30 mg/ml (por exemplo, cerca de 25 mg/ml) na composição.

As composições podem ser apresentadas em frascos, ou podem ser apresentadas em seringas preenchidas prontas. As seringas podem ser fornecidas com ou sem agulhas. Uma seringa incluirá uma dose única da composição, enquanto um frasco pode incluir uma dose única ou múltiplas doses.

Composições aquosas da invenção também são adequadas para reconstituição de outras vacinas a partir de uma forma liofilizada. Quando uma composição da invenção tiver que ser usada para essa reconstituição extemporânea, a invenção fornece um kit, que pode compreender dois frascos, ou pode compreender uma seringa preenchida pronta e um frasco, com o conteúdo da seringa sendo usado para reativar o conteúdo do frasco antes da injeção.

As composições da invenção podem ser embaladas em forma de dose unitária ou em forma de múltiplas doses. Para formas de múltiplas doses, são preferidos frascos em relação às seringas pré-preenchidas. Volumes de dosagem eficazes podem ser rotineiramente estabelecidos, mas uma dose humana típica da composição possui um volume de 0,5 ml, por exemplo, para injeção intramuscular.

O pH da composição é tipicamente entre 6 e 8, por exemplo, cerca de 7. Um pH estável pode ser mantido pelo uso de um tampão. Se uma composição compreende um hidróxido de alumínio sal, é típico usar um tampão de histidina [133]. A composição pode ser estéril e/ou isenta de pirógeno. As composições da invenção podem ser isotônicas com relação aos humanos.

As composições da invenção são imunogênicas e são, mais preferivelmente, composições de vacina. As vacinas de acordo com a invenção podem ser profiláticas (ou seja, para evitar infecção) ou terapêuticas (ou seja, para tratar infecção), mas tipicamente serão profiláticas. As composições imunogênicas usadas como vacinas compreendem uma quantidade imunologicamente eficaz de antígeno(s), bem como quaisquer outros componentes, como necessário. O termo "quantidade imunologicamente eficaz" significa que a administração daquela quantidade a um indivíduo, tanto em uma dose única como parte de uma série, é eficaz para tratamento ou prevenção. Essa quantidade varia, dependendo da saúde e da condição física do indivíduo a ser tratado, da idade, do grupo taxonômico do indivíduo a ser tratado (por exemplo, primata não humano, primata etc.), da capacidade do sistema imune do indivíduo para sintetizar anticorpos, do grau de proteção desejado, da formulação da vacina, da avaliação do médico responsável da situação médica e de outros fatores relevantes. Espera-se que a quantidade cairá em uma gama relativamente ampla que pode ser determinada por meio de experimentos de rotina.

Dentro de cada dose, a quantidade do antígeno sacarídico individual estará geralmente entre 1-50 µg

(medidos como massa de sacarídeo), por exemplo, cerca de 1 µg, cerca de 2,5 µg, cerca de 4 µg, cerca de 5 µg ou cerca de 10 µg.

S. aureus afeta várias áreas do corpo e, portanto, as composições da invenção podem ser preparadas em várias formas. Por exemplo, as composições podem ser preparadas como injetáveis, como soluções ou suspensões líquidas. A composição pode ser preparada para administração pulmonar, por exemplo, como um inalador, usando um pó fino ou um spray. A composição pode ser preparada como um supositório ou pessário. A composição pode ser preparada para administração nasal, aural ou ocular, por exemplo, como spray, gotas, gel ou pó [por exemplo, referências 134 e 135]. O Sucesso com a administração nasal de sacarídeos pneumocócicos [136, 137], sacarídeos de Hib [138], sacarídeos de MenC [139] e misturas de conjugados sacarídicos de Hib e MenC [140] foi relatado.

As composições da invenção podem incluir um antimicrobiano, particularmente quando embaladas em formato de múltiplas doses.

As composições da invenção podem compreender detergente, por exemplo, um Tween (polissorbato), por exemplo, Tween 80. Detergentes estão geralmente presentes em níveis baixos, por exemplo, <0,01%.

As composições da invenção podem incluir sais de sódio (por exemplo, cloreto de sódio) para gerar tonicidade. Uma concentração de 10 ± 2 mg/ml de NaCl é típica.

As composições da invenção geralmente incluirão um tampão. Um tampão fosfato é típico.

As composições da invenção geralmente serão

administradas em conjunto com outros agentes imunorreguladores. Em particular, as composições normalmente incluirão um ou mais adjuvantes. Esses adjuvantes incluem, sem limitação:

A. Composições que contêm minerais

Composições que contêm minerais adequadas para uso como adjuvantes na invenção incluem sais minerais, tais como sais de alumínio e sais de cálcio. A invenção inclui sais minerais, tais como hidróxidos (por exemplo, oxihidróxidos), fosfatos (por exemplo, hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos etc. [por exemplo, veja os Capítulos 8 e 9 da referência 141], ou misturas de diferentes compostos minerais (por exemplo, uma mistura de um adjuvante de fosfato e um adjuvante de hidróxido, opcionalmente com um excesso do fosfato), com os compostos assumindo qualquer forma adequada (por exemplo, gel, cristalina, amorfa etc.), e com a adsorção ao sal (ou sais) sendo típica. As composições contendo minerais também podem ser formuladas como uma partícula de sal metálico [142].

Os sais de alumínio podem ser incluídos em vacinas da invenção de tal forma que a dose de Al^{3+} esteja entre 0,2 e 1,0 mg por dose.

Um adjuvante de fosfato de alumínio típico é hidroxifosfato de alumínio amorfo, com uma proporção molar de PO_4/Al entre 0,84 e 0,92, incluindo a 0,6 mg de Al^{3+}/ml. A adsorção com uma dose baixa de fosfato de alumínio pode ser usada, por exemplo, entre 50 e 100 µg de Al^{3+} por conjugado por dose. Quando um fosfato de alumínio é usado e é desejado não adsorver um antígeno ao adjuvante, isso é favorecido pela inclusão de íons fosfato livres solução

(por exemplo, pelo uso de um tampão de fosfato).

B. Emulsões oleosas

Composições de emulsão oleosa adequadas para uso como adjuvantes na invenção incluem emulsões esqualeno-água, por exemplo, MF59 (esqualeno 5%, TWEEN™ 80 0,5% e Span 85 0,5%, formulado em partículas submícron usando um microfluidificador) [Capítulo 10 da referência 141; veja também as referências 143-145]. MF59 é usado como o adjuvante na vacina de subunidade trivalente de vírus influenza FLUAD™.

Adjuvantes particularmente úteis para uso nas composições são emulsões óleo-em-água submícron. Emulsões óleo-em-água submícron preferidas para uso neste pedido são emulsões esqualeno/água que opcionalmente contêm quantidades variáveis de MTP-PE, por exemplo, uma emulsão óleo-em-água submícron que contém 4-5% p/v de esqualeno, 0,25-1,0% p/v de Tween 80 (monooleato de polioxietilenossorbitano) e/ou 0,25-1,0% de Span 85 (trioleato de sorbitano) e, opcionalmente, N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosfoforiloxi)-etilamina (MTP-PE). Emulsões óleo-em-água submícron, métodos de sua produção e agentes imunoestimulantes, por exemplo, muramil peptídeos, para uso nas composições, são descritos em detalhe nas referências 143 e 146-147.

Adjuvante completo de Freund (CFA) e adjuvante incompleto de Freund (IFA) também podem ser usados como adjuvantes na invenção.

C. Formulações de saponina [capítulo 22 da referência 141]

Formulações de saponina também podem ser usadas como adjuvantes na invenção. Saponinas formam um grupo heterólogo de glicosídeos de esterol e glicosídeos de triterpenóide que são encontrados na casca, folhas, caules, raízes e até mesmo nas flores das árvores de uma ampla variedade de espécies de plantas. As saponinas isoladas da casca da árvore Molina *Quillaia saponaria* foram amplamente estudadas como adjuvantes. As saponinas também podem ser obtidas comercialmente de *Smilax ornata* (salsaparrilha), *Gypsophilla paniculata* ("mosquitinho" ou "branquinha") e *Saponaria officianalis* ("erva saboeira", "saponária"). As formulações com saponina como adjuvante incluem formulações purificadas como, por exemplo, QS21, além de formulações lipídicas, tais como ISCOMs.

Composições de saponina foram purificadas usando HPLC e RP-HPLC. Com o uso dessas técnicas, foram identificadas frações purificadas específicas, incluindo QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B e QH-C. De preferência, a saponina é QS21. Um método de produção de QS21 é revelado na referência 148. Formulações de saponina também podem compreender um esterol como, por exemplo, colesterol [149].

Podem ser usadas combinações de saponinas e de colesteróis para formar partículas únicas chamadas complexos imunoestimulantes (ISCOMs) [capítulo 23 da referência 141]. ISCOMs tipicamente também incluem um fosfolipídeo como, por exemplo, fosfatidiletanolamina ou fosfatidilcolina. Qualquer saponina conhecida pode ser usada em ISCOMs. De preferência, o ISCOM inclui um ou mais de QuilA, QHA e QHC. ISCOMs são ainda descritos nas referências 149-151. Opcionalmente, os ISCOMs podem ser

desprovidos de detergente adicional [153].

Uma revisão do desenvolvimento de adjuvantes à base de saponina pode ser encontrada nas referências 153 e 154.

D. Virossomos e partículas vírus-*like*

Virossomos e partículas vírus-*like* (VLPs) também podem ser usadas como adjuvantes na invenção. Essas estruturas geralmente contêm uma ou mais proteínas de um vírus opcionalmente combinadas ou formuladas com um fosfolipídeo. São geralmente não patogênicos, não replicantes, e geralmente não contêm nada do genoma viral nativo. As proteínas virais podem ser produzidas de forma recombinante ou isoladas de vírus inteiros. Essas proteínas virais adequadas para uso em virossomos ou VLPs incluem proteínas derivadas do vírus influenza (tais como HA ou NA), vírus da Hepatite B (tais como proteínas centrais ou do capsídeo), vírus da Hepatite E, vírus do sarampo, vírus Sindbis, Rotavírus, vírus da Febre Aftosa, Retrovírus, vírus Norwalk, vírus do Papiloma humano, HIV, RNA-fagos, Qβ-fago (como, por exemplo, proteínas de revestimento), GA-fago, fr-fago, AP205 fago e Ty (por exemplo, proteína p1 do retrotransposon Ty). VLPs são discutidas com mais detalhe nas referências 155-160. Virossomos são discutidos ainda, por exemplo, na referência 161.

E. Derivados bacterianos ou microbianos

Adjuvantes adequados para uso na invenção incluem derivados bacterianos ou microbianos, tais como derivados atóxicos de lipopolissacarídeo enterobacteriano (LPS), derivados de Lipídeo A, oligonucleotídeos imunoestimulantes e toxinas de ribosilação de ADP, e derivados detoxificados destas.

Derivados atóxicos de LPS incluem monofosforil lipídeo A (MPL) e MPL 3-O-desacilado (3dMPL). 3dMPL é uma mistura de 3 monofosforil lipídeo A des-O-acilado com 4, 5 ou 6 cadeias aciladas. Uma forma de "partícula pequena" preferida de 3 monofosforil lipídeo A Des-O-acilado é revelada na referência 162. Tais "partículas pequenas" de 3dMPL são suficientemente pequenas para serem filtradas de forma estéril através de uma membrana de 0,22 µm [162]. Outros derivados atóxicos de LPS incluem miméticos de monofosforil lipídeo A, tais como derivados de fosfato de aminoalquil glicosaminida, por exemplo, RC 529 [163, 164].

Derivados de Lipídeo A incluem derivados de lipídeo A de *Escherichia coli* como, por exemplo, OM-174. OM-174 é descrito, por exemplo, nas referências 165 e 166.

Oligonucleotídeos imunoestimulantes adequados para uso como adjuvantes na invenção incluem seqüências de nucleotídeos contendo um motivo CpG (uma seqüência de dinucleotídeos que contém uma citosina não metilada ligada por uma ligação fosfato a uma guanosina). RNA de fita dupla e oligonucleotídeos contendo seqüências palindrômicas ou poli(dG) também mostraram ser imunoestimulantes.

Os CpGs podem incluir modificações/análogos de nucleotídeos, tais como modificações de fosforotioato, e podem ser de fita dupla ou de fita simples. As referências 167, 168 e 169 revelam possíveis substituições análogas, por exemplo, troca de guanosina com 2'-desóxi-7-deazaguanosina. O efeito adjuvante de oligonucleotídeos CpG é ainda discutido nas referências 170-175.

A seqüência CpG pode ser dirigida a TLR9 como, por exemplo, o motivo GTCGTT ou TTCGTT [176]. A seqüência CpG

pode ser específica para a indução de uma resposta imune Th1, por exemplo, um CpG-A ODN, ou ela pode ser mais específica para a indução de uma resposta de célula B, por exemplo, um CpG-B ODN. ODNs CpG-A e CpG-B são discutidos nas referências 177-179. De preferência, o CpG é um CpG-A ODN.

De preferência, o oligonucleotídeo CpG é construído de tal forma que a extremidade 5' esteja acessível para reconhecimento do receptor. Opcionalmente, duas seqüências de oligonucleotídeos CpG podem ser anexadas em suas extremidades 3' para a formação de "imunômeros". Veja, por exemplo, as referências 176 e 180-182.

Toxinas bacterianas de ribosilação de ADP e derivados desintoxicados destas podem ser usados como adjuvantes na invenção. De preferência, a proteína é derivada de *E. coli* (ou seja, enterotoxina termolábil de *E. coli* "LT"), cólera ("CT") ou pertussis ("PT"). O uso de toxinas desintoxicadas de ribosilação de ADP como adjuvantes mucosos é descrito na referência 183 e como adjuvantes parenterais na referência 184. A toxina ou toxóide está preferivelmente na forma de uma holotoxina, que compreende subunidades tanto A quanto B. De preferência, a subunidade A contém uma mutação detoxificante; preferivelmente, a subunidade B não está mutada. De preferência, o adjuvante é um mutante detoxificado de LT como, por exemplo, LT-K63, LT-R72 e LT G192. O uso de toxinas de ribosilação de ADP e derivados desintoxicados destas, particularmente LT-K63 e LT-R72, como adjuvantes, pode ser encontrado nas referências 185-192. A referência numérica para substituições de aminoácidos é baseada, de preferência, nos

alinhamentos das subunidades A e B das toxinas de ribosilação de ADP apresentadas na referência 193, aqui especificamente incorporada por referência em sua totalidade.

F. Imunomoduladores humanos

Imunomoduladores humanos adequados para uso como adjuvantes na invenção incluem citocinas, por exemplo, interleucinas (por exemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 [194] etc.) [195], interferons (por exemplo, interferon-γ), fator estimulador de colônia de macrófagos e fator de necrose tumoral.

G. Bioadesivos e mucoadesivos

Bioadesivos e mucoadesivos também podem ser usados como adjuvantes na invenção. Bioadesivos adequados incluem microesferas de ácido hialurônico esterificado [196] ou mucoadesivos como, por exemplo, derivados entrecruzados de poli(ácido acrílico), álcool polivinílico, polivinil pirrolidona, polissacarídeos e carboximetilcelulose. Quitosana e seus derivados também podem ser usados como adjuvantes na invenção [197].

H. Micropartículas

Micropartículas também podem ser usadas como adjuvantes na invenção. Micropartículas (ou seja, uma partícula de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 150 µm de diâmetro, mais preferivelmente, de aproximadamente 200 nm a aproximadamente 30 µm de diâmetro e, principalmente, de aproximadamente 500 nm a aproximadamente 10 µm de diâmetro) formadas por materiais que são biodegradáveis e atóxicos (por exemplo, um poli(ácido α-hidróxi), um ácido polihidroxibutírico, um poliortoéster,

um polianidrido, uma policaprolactona etc.), com poli(lactida-co-glicolida), são preferidas, opcionalmente tratadas para terem uma superfície carregada negativamente (por exemplo, com SDS) ou uma superfície carregada positivamente (por exemplo, com um detergente catiônico, como CTAB).

I. Lipossomos (Capítulos 13 e 14 da referência 141)

Exemplos de formulações de lipossomo adequadas para uso como adjuvantes são descritos nas referências 198-200.

J. Formulações de éter de polioxietileno e éster polioxietileno

Adjuvantes adequados para uso na invenção incluem éteres de polioxietileno e ésteres de polioxietileno [201]. Tais formulações ainda incluem tensoativos de éster de polioxietileno sorbitano em combinação com um octoxinol [202], além de tensoativos de éteres ou éster de polioxietileno alquil em combinação com pelo menos um tensoativo não iônico adicional, por exemplo, um octoxinol [203]. Éteres de polioxietileno preferidos são selecionados do seguinte grupo: éter de polioxietileno-9-lauril (*laureth* 9), éter de polioxietileno-9-esteoril, éter de polioxietileno-8-esteoril, éter de polioxietileno-4-lauril, éter de polioxietileno-35-lauril e éter de polioxietileno-23-lauril.

K. Polifosfazeno (PCPP)

Formulações de PCPP são descritas, por exemplo, nas referências 204 e 205.

L. Muramil peptídeos

Exemplos de muramil peptídeos adequados para uso como adjuvantes na invenção incluem N-acetil-muramil-L-treonil-

D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP) e N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE).

M. Compostos de imidazoquinolona.

Exemplos de compostos de imidazoquinolona adequados para uso adjuvantes na invenção incluem Imiquamod e seus homólogos (por exemplo, "Resiquimod 3M"), descritos com mais detalhe nas referências 206 e 207.

N. Compostos de tiossemicarbazona

Exemplos de compostos de tiossemicarbazona, além de métodos de formulação, fabricação e avaliação de todos os compostos adequados para uso como adjuvantes na invenção, incluem aqueles descritos na referência 208. As tiossemicarbazonas são particularmente eficazes na estimulação de células mononucleares do sangue periférico humano para a produção de citocinas, por exemplo, TNF-α.

O. Compostos de triptantrina

Exemplos de compostos de triptantrina, além de métodos de formulação, fabricação e avaliação para todos os compostos adequados para uso como adjuvantes na invenção, incluem aqueles descritos na referência 209. Os compostos de triptantrina são particularmente eficazes na estimulação de células mononucleares do sangue periférico humano para a produção de citocinas, por exemplo, TNF-α.

A invenção também compreende combinações de aspectos de um ou mais dos adjuvantes identificados acima. Por exemplo, as seguintes combinações podem ser usadas como composições adjuvantes na invenção: (1) uma saponina e uma emulsão óleo-em-água [210]; (2) uma saponina (por exemplo,

QS21) + um derivado atóxico de LPS (por exemplo, 3dMPL) [211]; (3) uma saponina (por exemplo, QS21) + um derivado atóxico de LPS (por exemplo, 3dMPL) + um colesterol; (4) uma saponina (por exemplo, QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + um esterol) [212]; (5) combinações de 3dMPL com, por exemplo, QS21 e/ou emulsões óleo-em-água [213]; (6) SAF, contendo 10% de esqualano, 0,4% de Tween 80™, 5% de polímero plurônico em bloco L121 e thr-MDP, microfluidificado em uma emulsão submícron ou turbilhonado para gerar uma emulsão com um tamanho de partícula maior; (7) sistema adjuvante Ribi™ (RAS) (Ribi Immunochem), contendo 2% de esqualeno, 0,2% de Tween 80 e um ou mais componentes da parede celular bacteriana do grupo que consiste em monofosforilipídeo A (MPL), dimicolato de trehalose (TDM) e esqueleto da parede celular (CWS), preferivelmente MPL + CWS (Detox™); e (8) um ou mais sais minerais (por exemplo, um sal de alumínio) + um derivado atóxico de LPS (por exemplo, 3dMPL).

Outras substâncias que atuam como agentes imunoestimulantes são discutidas no capítulo 7 da referência 141.

O uso de adjuvantes de sal de alumínio é particularmente útil, e antígenos são geralmente adsorvidos a esses sais. Os conjugados Menjugate™ e NeisVac™ usam um adjuvante de hidróxido, enquanto Meningitec™ usa um adjuvante de fosfato. É possível, em composições da invenção, adsorver alguns antígenos a um hidróxido de alumínio, mas ter outros antígenos em associação com um fosfato de alumínio. Tipicamente, no entanto, apenas um único sal é usado, por exemplo, um hidróxido ou um fosfato,

mas não ambos. Nem todos os conjugados precisam estar adsorvidos, ou seja, alguns ou todos podem estar livres em solução.

Métodos de tratamento

A invenção também fornece um método para despertar uma resposta imune em um mamífero, que compreende a administração de uma composição farmacêutica da invenção ao mamífero. A resposta imune é preferivelmente protetora e preferivelmente envolve anticorpos. O método pode despertar uma resposta de reforço.

O mamífero é preferivelmente um ser humano. Quando a vacina é para uso profilático, o humano é preferivelmente uma criança (por exemplo, um bebê ou lactente) ou um adolescente; quando a vacina é para uso terapêutico, o humano é preferivelmente um adulto. Uma vacina destinada às crianças também pode ser administrada a adultos, por exemplo, para avaliar segurança, dosagem, imunogenicidade etc. Uma classe preferida de humanos para tratamento são pacientes em risco de infecção hospitalar, particularmente aqueles com doença renal em estágio final e/ou em hemodiálise. Outros pacientes em risco de infecção hospitalar também são preferidos, por exemplo, pacientes imunodeficientes ou aqueles que foram submetidos a cirurgias, especialmente cirurgia cardíaca, ou trauma. Outra classe preferida de humanos para tratamento consiste em pacientes em risco de bacteremia. Uma classe preferida adicional é composta por pacientes que sofrem ou que foram previamente expostos ao vírus influenza, na medida em que *S. aureus* foi ligado à pneumonia pós-infecção nesses pacientes.

A invenção também fornece uma composição da invenção para uso como um medicamento. O medicamento é preferivelmente capaz de despertar uma resposta imune em um mamífero (ou seja, é uma composição imunogênica) e é mais preferivelmente uma vacina.

A invenção também fornece o uso de um conjugado da invenção na fabricação de um medicamento para despertar uma resposta imune em um mamífero.

Esses usos e métodos são preferivelmente para a prevenção e/ou tratamento de uma doença causada por *S. aureus*, por exemplo, infecções cutâneas, por exemplo, impetigo, abscessos, celulite, foliculite, terçóis, furúnculos, carbúnculos, síndrome da pele escalada e abscessos, artrite séptica, pneumonia, mastite, flebite, meningite, infecções do trato urinário, osteomielite, endocardite, síndrome de choque térmico (TSS), septicemia e infecções hospitalares.

Uma forma de se verificar a eficácia do tratamento terapêutico envolve o monitoramento da infecção por *S. aureus* após administração da composição da invenção. Uma forma de se verificar a eficácia do tratamento profilático envolve o monitoramento de respostas imunes contra os antígenos de *S. aureus* após administração da composição.

Composições da invenção preferidas podem conferir uma titulação de anticorpo em um paciente que é superior ao critério para soroproteção para cada componente antigênico para uma percentagem aceitável de pacientes humanos. Antígenos com uma titulação de anticorpo associada acima da qual um hospedeiro é considerado como soroconvertido contra o antígeno são bem conhecidos, e essas titulações são

publicadas por organizações como, por exemplo, a Organização Mundial de Saúde (OMS). De preferência, mais do que 80% de uma amostra estatisticamente significante de indivíduos são soroconvertidos, mais preferivelmente mais do que 90%, ainda mais preferivelmente mais do que 93% e, mais preferivelmente ainda, 96-100%.

As composições da invenção geralmente serão administradas diretamente a um paciente. A liberação direta pode ser obtida por injeção parenteral (por exemplo, no espaço subcutâneo, intraperitoneal, intravenoso, intramuscular ou intersticial de um tecido), ou por administração retal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intranasal, ocular, aural, pulmonar ou por outra administração mucosa. A administração intramuscular à coxa ou à parte superior do braço é preferida. A injeção pode ser por meio de uma agulha (por exemplo, uma agulha hipodérmica), mas a injeção sem agulha pode alternativamente ser usada. Uma dose intramuscular típica é de 0,5 ml.

A invenção pode ser usada para despertar imunidade sistêmica e/ou mucosa.

A dosagem do tratamento pode ser um esquema de dose única ou um esquema de múltiplas doses. Múltiplas doses podem ser usadas em um esquema de imunização primária e/ou em um esquema de imunização de reforço. Um esquema de dose primária pode ser seguido por um esquema de dose de reforço. O intervalo de tempo adequado entre doses de sensibilização (por exemplo, entre 4-16 semanas), e entre sensibilização e reforço, pode ser determinado rotineiramente.

Antígenos de *S. aureus*

Como mencionado acima, um ou mais antígenos de *S. aureus* adicionais podem ser incluídos em composições da invenção. Os antígenos podem ser antígenos protéicos ou sacarídicos. Antígenos protéicos de *S. aureus* podem ser usados como proteínas de transporte para conjugados da invenção, proteínas de transporte para outros conjugados, ou como antígenos protéicos não conjugados. Antígenos sacarídicos de *S. aureus* podem ser usados como os sacarídeos para outro conjugado ou como antígenos sacarídicos não conjugados.

Antígenos sacarídicos de *S. aureus* adequados incluem o exopolissacarídeo de *S. aureus*, que é uma poli-N-acetilglucosamina (PNAG). Esse polissacarídeo está presente tanto em *S. aureus* quanto em *S. epidermidis*, e pode ser isolado de qualquer fonte [214, 215]. Por exemplo, PNAG pode ser isolada de *S. aureus* cepa MN8m [216]. O antígeno sacarídico pode ser um polissacarídeo que possui o tamanho que surge durante purificação do exopolissacarídeo por bactérias, ou pode ser um polissacarídeo obtido por fragmentação de um polissacarídeo desse tipo, por exemplo, o tamanho pode variar de mais de 400 kDa até entre 75 e 400 kDa, ou entre 10 e 75 kDa, ou até 30 unidades de repetição. O antígeno sacarídico pode ter vários graus de N-acetilação e, como descrito na referência 217, a PNAG pode ser menos de 40% N-acetilada (por exemplo, menos de 35, 30, 20, 15, 10 ou 5% N-acetilada; PNAG desacetilada também é conhecida como dPNAG). Epitopos desacetilados de PNAG podem despertar anticorpos que são capazes de mediar a morte opsônica. A preparação de dPNAG é descrita na referência 218. A PNAG

pode ou não ser O-succinilada; por exemplo, ela pode ser O-succinilada em menos de 25, 20, 15, 10, 5, 2, 1 ou 0,1% de resíduos. A PNAG pode ser conjugada a uma molécula de transporte, como descrito acima, ou, alternativamente, não conjugada.

Outro antígeno sacarídico de *S. aureus* adequado é o antígeno do tipo 336, que é uma hexosamina ligada em β sem O-acetilação [219, 220]. O antígeno do tipo 336 reage de forma cruzada com anticorpos despertados contra a cepa 336 (ATCC 55804). O antígeno do tipo 336 pode ser conjugado a uma molécula de transporte, como descrito acima, ou, alternativamente, não conjugado.

Antígenos protéicos de *S. aureus* adequados incluem os seguintes antígenos de *S. aureus* (ou antígenos que compreendem fragmento(s) imunogênico(s) destes) [por exemplo, veja as referências 221-228]: AhpC, AhpF, autolisina amidase, autolisina glucosaminidase, proteína de ligação de colágeno CAN, EbhB, GehD lipase, proteína de ligação de heparina HBP (17 kDa), receptor de laminina, MAP, MntC (também conhecido como SitC), MRPII, Npase, ORF0594, ORF0657n, ORF0826, PBP4, RAP (proteína de ativação de RNA III), Sai-1, SasK, SBI, SdrG, SdrH, SSP-1, SSP-2 e proteína de ligação de vitronectina.

Antígenos protéicos de *S. aureus* adequados adicionais incluem um antígeno clfA; um antígeno clfB; um antígeno sdrE2; um antígeno sdrC; um antígeno sasF, um antígeno emp; um antígeno sdrD; um antígeno spa; um antígeno esaC; um antígeno esxA; um antígeno esxB; um antígeno sta006; um antígeno isdC; um antígeno Hla; um antígeno sta011; um antígeno isdA; um antígeno isdB; e um antígeno sta073, como

descrito abaixo. Um ou mais (ou seja, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou mais) desses antígenos podem estar presentes em uma composição da invenção. Desses antígenos, o uso de um ou mais (ou seja, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou mais) de um antígeno esxA; um antígeno esxB; um antígeno sta006; um antígeno Hla; um antígeno sta011; e/ou um antígeno sta073 é especificamente previsto.

Por exemplo, uma composição da invenção pode ainda compreender uma ou mais das seguintes combinações de antígenos protéicos de *S. aureus*:

(1) Um antígeno esxA, um antígeno esxB, um antígeno sta006 e um antígeno Hla. Os antígenos esxA e esxB podem normalmente ser combinados como um polipeptídeo híbrido, como discutido abaixo, por exemplo, um híbrido EsxAB com um antígeno esxB abaixo de um antígeno esxA. O antígeno Hla pode ser um mutante detoxificado, por exemplo, incluindo uma mutação H35L.

(2) Um antígeno esxA, um antígeno esxB, um antígeno sta006 e um antígeno sta011. Os antígenos esxA e esxB podem ser combinados como um polipeptídeo híbrido, como discutido abaixo, por exemplo, um híbrido EsxAB.

(3) Um antígeno esxA, um antígeno esxB e um antígeno sta011. Os antígenos esxA e esxB podem normalmente ser combinados como um polipeptídeo híbrido, como discutido abaixo, por exemplo, um híbrido EsxAB.

(4) Um antígeno esxA, um antígeno esxB, um antígeno Hla, um antígeno sta006 e um antígeno sta011. Os antígenos esxA e esxB podem ser combinados como um polipeptídeo híbrido, como discutido abaixo, por exemplo, um híbrido EsxAB. O antígeno Hla pode ser um mutante detoxificado, por

exemplo, incluindo uma mutação H35L.

(5) Um antígeno esxA, um antígeno esxB e um antígeno Hla. Os antígenos esxA e esxB podem normalmente ser combinados como um polipeptídeo híbrido, como discutido abaixo, por exemplo, um híbrido EsxAB. O antígeno Hla pode ser um mutante detoxificado, por exemplo, incluindo uma mutação H35L.

(6) Um antígeno Hla, um antígeno sta006 e um antígeno sta011. O antígeno Hla pode ser um mutante detoxificado, por exemplo, incluindo uma mutação H35L.

(7) Um antígeno esxA e um antígeno esxB. Os antígenos esxA e esxB podem normalmente ser combinados como um polipeptídeo híbrido, como discutido abaixo, por exemplo, um híbrido EsxAB.

(8) Um antígeno esxA, um antígeno esxB e um antígeno sta006. Os antígenos esxA e esxB podem normalmente ser combinados como um polipeptídeo híbrido, como discutido abaixo, por exemplo, um híbrido EsxAB.

(9) Um antígeno esxA, um antígeno esxB, um antígeno sta011 e um antígeno sta073. Os antígenos esxA e esxB podem ser combinados como um polipeptídeo híbrido, como discutido abaixo, por exemplo, um híbrido EsxAB.

(10) Um antígeno sta006 e um antígeno sta011.

Antígenos de *Staphylococcus aureus* adicionais são revelados na referência 229.

clfA

O antígeno "clfA" é anotado como "fator de aglutinação A". Na cepa NCTC 8325, clfA é SAOUHSC_00812 e possui a seqüência de aminoácidos ID. DE SEQ. N°: 1 (GI: 88194572). Na cepa Newman, ele é nwmn_0756 (GI: 151220968).

Antígenos clfA úteis podem despertar um anticorpo (por exemplo, quando administrados a um ser humano) que reconhece o ID. DE SEQ. N°: 1 e/ou podem compreender uma seqüência de aminoácidos: (a) que possui 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) para o ID. DE SEQ. N°: 1; e/ou (b) que compreende um fragmento de pelo menos "n" aminoácidos consecutivos do ID. DE SEQ. N°: 1, em que "n" é 7 ou mais (por exemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 ou mais). Essas proteínas clfA incluem variantes do ID. DE SEQ. N°: 1. Fragmentos preferidos de (b) compreendem um epitopo do ID. DE SEQ. N°: 1. Outros fragmentos preferidos não possuem um ou mais aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou mais) do terminal C e/ou um ou mais aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou mais) do terminal N do ID. DE SEQ. N°: 1, embora retenham pelo menos um epitopo do ID. DE SEQ. N°: 1. Os 368 aminoácidos finais do terminal C do ID. DE SEQ. N°: 1 normalmente podem ser omitidos. Os primeiros 39 aminoácidos do terminal N do ID. DE SEQ. N°: 1 normalmente podem ser omitidos. Outros fragmentos omitem um ou mais domínios de proteína.

O ID. DE SEQ. N°: 2 é um fragmento útil do ID. DE SEQ. N°: 1 ("$ClfA_{40-559}$"). Esse fragmento omite a região repetitiva longa em direção ao terminal C do ID. DE SEQ. N°: 1.

clfB

O antígeno "clfB" é anotado como "fator de aglutinação B". Na cepa NCTC 8325, clfB é SAOUHSC_02963 e possui a

seqüência de aminoácidos ID. DE SEQ. N°: 3 (GI: 88196585). Na cepa Newman, ele é nwmn_2529 (GI: 151222741).

Antígenos clfB úteis podem despertar um anticorpo (por exemplo, quando administrados a um ser humano) que reconhece o ID. DE SEQ. N°: 3 e/ou podem compreender uma seqüência de aminoácidos: (a) que possui 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) para o ID. DE SEQ. N°: 3; e/ou (b) que compreende um fragmento de pelo menos "n" aminoácidos consecutivos do ID. DE SEQ. N°: 3, em que "n" é 7 ou mais (por exemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 ou mais). Essas proteínas clfB incluem variantes do ID. DE SEQ. N°: 3. Fragmentos preferidos de (b) compreendem um epitopo do ID. DE SEQ. N°: 3. Outros fragmentos preferidos não possuem um ou mais aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou mais) do terminal C e/ou um ou mais aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou mais) do terminal N do ID. DE SEQ. N°: 3, embora retenham pelo menos um epitopo do ID. DE SEQ. N°: 3. Os 40 aminoácidos finais do terminal C do ID. DE SEQ. N°: 3 normalmente podem ser omitidos. Os primeiros 44 aminoácidos do terminal N do ID. DE SEQ. N°: 3 normalmente podem ser omitidos. Outros fragmentos omitem um ou mais domínios de proteína. ClfB é naturalmente uma proteína longa e, portanto, o uso de fragmentos é útil, por exemplo, para purificação, manipulação, fusão, expressão etc.

O ID. DE SEQ. N°: 4 é um fragmento útil do ID. DE SEQ. N°: 3 ("$ClfB_{45-552}$"). Esse fragmento inclui o domínio mais

exposto de ClfB e é mais facilmente usado em uma escala industrial. Ele também reduz a similaridade do antígeno com proteínas humanas. Outros fragmentos úteis, com base em um modelo de 3 domínios de ClfB, incluem: ClfB45-360 (também conhecido como CLfB-N12; ID. DE SEQ. N°: 5); $ClfB_{212-542}$ (também conhecido como CLfB-N23; ID. DE SEQ. N°: 6); e $ClfB_{360-542}$ (também conhecido como CLfB-N3; ID. DE SEQ. N°: 7).

sdrE2

O antígeno "sdrE2" é anotado como "proteína de ligação de fibrinogênio/sialoproteína óssea rica em Ser-Asp - SdrE". Na cepa Newman, sdrE2 é NWMN_0525 e possui a seqüência de aminoácidos ID. DE SEQ. N°: 8 (GI: 151220737).

Antígenos sdrE2 úteis podem despertar um anticorpo (por exemplo, quando administrados a um ser humano) que reconhece o ID. DE SEQ. N°: 8 e/ou podem compreender uma seqüência de aminoácidos: (a) que possui 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) para o ID. DE SEQ. N°: 8; e/ou (b) que compreende um fragmento de pelo menos "n" aminoácidos consecutivos do ID. DE SEQ. N°: 8, em que "n" é 7 ou mais (por exemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 ou mais). Essas proteínas sdrE2 incluem variantes do ID. DE SEQ. N°: 8. Fragmentos preferidos de (b) compreendem um epitopo do ID. DE SEQ. N°: 8. Outros fragmentos preferidos não possuem um ou mais aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou mais) do terminal C e/ou um ou mais aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou mais)

do terminal N do ID. DE SEQ. N°: 8, embora retenham pelo menos um epitopo do ID. DE SEQ. N°: 8. Os 38 aminoácidos finais do terminal C do ID. DE SEQ. N°: 8 normalmente podem ser omitidos. Os primeiros 52 aminoácidos do terminal N do ID. DE SEQ. N°: 8 normalmente podem ser omitidos. Outros fragmentos omitem um ou mais domínios de proteína. SdrE2 é naturalmente uma proteína longa e, portanto, o uso de fragmentos é muito útil, por exemplo, para purificação, manipulação, fusão, expressão etc.

O ID. DE SEQ. N°: 9 é um fragmento útil do ID. DE SEQ. N°: 8 ("$Sdr_{E53-632}$"). Esse fragmento inclui o domínio mais exposto de SdrE2 e é mais facilmente usado em uma escala industrial. Ele também reduz a similaridade do antígeno com proteínas humanas.

sdrC

O antígeno "sdrC" é anotado como "proteína sdrC". Na cepa NCTC 8325, sdrC é SAOUHSC_00544 e possui a seqüência de aminoácidos ID. DE SEQ. N°: 10 (GI: 88194324).

Antígenos sdrC úteis podem despertar um anticorpo (por exemplo, quando administrados a um ser humano) que reconhece o ID. DE SEQ. N°: 10 e/ou podem compreender uma seqüência de aminoácidos: (a) que possui 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) para o ID. DE SEQ. N°: 10; e/ou (b) que compreende um fragmento de pelo menos "n" aminoácidos consecutivos do ID. DE SEQ. N°: 10, em que "n" é 7 ou mais (por exemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 ou mais). Essas proteínas sdrC incluem variantes do ID. DE SEQ. N°: 10. Fragmentos preferidos de

(b) compreendem um epitopo do ID. DE SEQ. N°: 10. Outros fragmentos preferidos não possuem um ou mais aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou mais) do terminal C e/ou um ou mais aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou mais) do terminal N do ID. DE SEQ. N°: 10, embora retenham pelo menos um epitopo do ID. DE SEQ. N°: 10. Os 38 aminoácidos finais do terminal C do ID. DE SEQ. N°: 10 normalmente podem ser omitidos. Os primeiros 50 aminoácidos do terminal N do ID. DE SEQ. N°: 10 normalmente podem ser omitidos. Outros fragmentos omitem um ou mais domínios de proteína. SdrC é naturalmente uma proteína longa e, portanto, o uso de fragmentos é útil, por exemplo, para purificação, manipulação, fusão, expressão etc.

O ID. DE SEQ. N°: 11 é um fragmento útil do ID. DE SEQ. N°: 10 ("$SdrC_{51-518}$"). Esse fragmento inclui o domínio mais exposto de SdrC e é mais facilmente usado em uma escala industrial. Ele também reduz a similaridade do antígeno com proteínas humanas.

sasF

O antígeno "sasF" é anotado como "proteína sasF". Na cepa NCTC 8325, sasF é SAOUHSC_02982 e possui a seqüência de aminoácidos ID. DE SEQ. N°: 12 (GI: 88196601).

Antígenos sasF úteis podem despertar um anticorpo (por exemplo, quando administrados a um ser humano) que reconhece o ID. DE SEQ. N°: 12 e/ou podem compreender uma seqüência de aminoácidos: (a) que possui 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) para o ID. DE SEQ. N°: 12; e/ou (b) que compreende um

fragmento de pelo menos "n" aminoácidos consecutivos do ID. DE SEQ. N°: 12, em que "n" é 7 ou mais (por exemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 ou mais). Essas proteínas sasF incluem variantes do ID. DE SEQ. N°: 12. Fragmentos preferidos de (b) compreendem um epitopo do ID. DE SEQ. N°: 12. Outros fragmentos preferidos não possuem um ou mais aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou mais) do terminal C e/ou um ou mais aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou mais) do terminal N do ID. DE SEQ. N°: 12, embora retenham pelo menos um epitopo do ID. DE SEQ. N°: 12. Os 39 aminoácidos finais do terminal C do ID. DE SEQ. N°: 12 normalmente podem ser omitidos. Os primeiros 37 aminoácidos do terminal N do ID. DE SEQ. N°: 12 normalmente podem ser omitidos. Outros fragmentos omitem um ou mais domínios de proteína.

emp

O antígeno "emp" é anotado como "proteína da matriz extracelular e proteína de ligação plasmática". Na cepa NCTC 8325, emp é SAOUHSC_00816 e possui a seqüência de aminoácidos ID. DE SEQ. N°: 13 (GI: 88194575). Na cepa Newman, ele é nwmn_0758 (GI: 151220970).

Antígenos emp úteis podem despertar um anticorpo (por exemplo, quando administrados a um ser humano) que reconhece o ID. DE SEQ. N°: 13 e/ou podem compreender uma seqüência de aminoácidos: (a) que possui 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) para o ID. DE SEQ. N°: 13; e/ou (b) que compreende um fragmento de pelo menos "n" aminoácidos consecutivos do ID.

DE SEQ. N°: 13, em que "n" é 7 ou mais (por exemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 ou mais). Essas proteínas emp incluem variantes do ID. DE SEQ. N°: 13. Fragmentos preferidos de (b) compreendem um epitopo do ID. DE SEQ. N°: 13. Outros fragmentos preferidos não possuem um ou mais aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou mais) do terminal C e/ou um ou mais aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou mais) do terminal N do ID. DE SEQ. N°: 13, embora retenham pelo menos um epitopo do ID. DE SEQ. N°: 13. Os primeiros 26 aminoácidos do terminal N do ID. DE SEQ. N°: 13 normalmente podem ser omitidos. Outros fragmentos omitem um ou mais domínios de proteína.

Os IDS. DE SEQ. N^{os}: 14, 15, 16 e 17 são fragmentos úteis do ID. DE SEQ. N°: 13 ("Emp_{35-340}", "Emp_{27-334}", "Emp_{35-334}" e "Emp_{27-147}", respectivamente).

sdrD

O antígeno "sdrD" é anotado como "proteína sdrD". Na cepa NCTC 8325, sdrD é SAOUHSC_00545 e possui a seqüência de aminoácidos ID. DE SEQ. N°: 18 (GI: 88194325).

Antígenos sdrD úteis podem despertar um anticorpo (por exemplo, quando administrados a um ser humano) que reconhece o ID. DE SEQ. N°: 18 e/ou podem compreender uma seqüência de aminoácidos: (a) que possui 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) para o ID. DE SEQ. N°: 18; e/ou (b) que compreende um fragmento de pelo menos "n" aminoácidos consecutivos do ID. DE SEQ. N°: 18, em que "n" é 7 ou mais (por exemplo, 8, 10,

12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 ou mais). Essas proteínas sdrD incluem variantes do ID. DE SEQ. N°: 18. Fragmentos preferidos de (b) compreendem um epitopo do ID. DE SEQ. N°: 18. Outros fragmentos preferidos não possuem um ou mais aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou mais) do terminal C e/ou um ou mais aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou mais) do terminal N do ID. DE SEQ. N°: 18, embora retenham pelo menos um epitopo do ID. DE SEQ. N°: 18. Os 38 aminoácidos finais do terminal C do ID. DE SEQ. N°: 18 normalmente podem ser omitidos. Os primeiros 52 aminoácidos do terminal N do ID. DE SEQ. N°: 18 normalmente podem ser omitidos. Outros fragmentos omitem um ou mais domínios de proteína. SdrD é naturalmente uma proteína longa e, portanto, o uso de fragmentos é muito útil, por exemplo, para purificação, manipulação, fusão, expressão etc.

O ID. DE SEQ. N°: 19 é um fragmento útil do ID. DE SEQ. N°: 18 ("$SdrD_{53-592}$"). Esse fragmento inclui o domínio mais exposto de SdrD e é mais facilmente usado em uma escala industrial. Ele também reduz a similaridade do antígeno com proteínas humanas. Outro fragmento útil, com o mesmo resíduo do terminal C, é SdrD394-592 (também conhecido como SdrD-N3; ID. DE SEQ. N°: 20).

spa

O antígeno "spa" é anotado como "proteína A" ou "SpA". Na cepa NCTC 8325, spa é SAOUHSC_00069 e possui a seqüência de aminoácidos ID. DE SEQ. N°: 21 (GI: 88193885). Na cepa Newman, ele é nwmn_0055 (GI: 151220267). Todas as cepas de *S. aureus* expressam o gene estrutural para spa, um fator de

virulência bem caracterizado cujo produto da proteína de superfície ancorada na parede celular possui cinco domínios de ligação de imunoglobulina altamente homólogos designados E, D, A, B e C [230]. Esses domínios exibem aproximadamente 80% de identidade no nível de aminoácido, possuem 56 a 61 resíduos de comprimento, e estão organizados como repetições em tandem [231]. SpA é sintetizado como uma proteína precursora com um peptídeo sinalizador do terminal N e um sinal de classificação do terminal C [232, 233]. spa ancorado na parede celular é exibido em grande abundância na superfície estafilocócica [234, 235]. Cada um de seus domínios de ligação de imunoglobulina é composto por α-hélices antiparalelas que se parecem com um feixe de três hélices e podem ligar o domínio Fc da imunoglobulina G (IgG) [236, 237], a cadeia pesada de V_H3 (Fab) de IgM (ou seja, o receptor de célula B) [238], o fator de von Willebrand em seu domínio A1 [239], e/ou o receptor de TNF-α I (TNFRI) [240], que é exibido nas superfícies de epitélios das vias aéreas.

Antígenos spa úteis podem despertar um anticorpo (por exemplo, quando administrados a um ser humano) que reconhece o ID. DE SEQ. N°: 21 e/ou podem compreender uma seqüência de aminoácidos: (a) que possui 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) para o ID. DE SEQ. N°: 21; e/ou (b) que compreende um fragmento de pelo menos "n" aminoácidos consecutivos do ID. DE SEQ. N°: 21, em que "n" é 7 ou mais (por exemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 ou mais). Essas proteínas spa incluem

variantes do ID. DE SEQ. N°: 21. Fragmentos preferidos de (b) compreendem um epitopo do ID. DE SEQ. N°: 21. Outros fragmentos preferidos não possuem um ou mais aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou mais) do terminal C e/ou um ou mais aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou mais) do terminal N do ID. DE SEQ. N°: 21, embora retenham pelo menos um epitopo do ID. DE SEQ. N°: 21. Os 35 aminoácidos finais do terminal C do ID. DE SEQ. N°: 21 normalmente podem ser omitidos. Os primeiros 36 aminoácidos do terminal N do ID. DE SEQ. N°: 21 normalmente podem ser omitidos. Outros fragmentos omitem um ou mais domínios de proteína. A referência 241 sugere que domínios de ligação de IgG individuais podem ser imunógenos úteis, isoladamente ou em combinação.

O ID. DE SEQ. N°: 22 é um fragmento útil do ID. DE SEQ. N°: 21 ("Spa_{37-325}"). Esse fragmento contém todos os cinco domínios de ligação de Ig de SpA e inclui o domínio mais exposto de SpA. Ele também reduz a similaridade do antígeno com proteínas humanas. Outros fragmentos úteis podem omitir 1, 2, 3 ou 4 dos domínios naturais A, B, C, D e/ou E. Como relatado na referência 241, outros fragmentos úteis podem incluir apenas 1, 2, 3 ou 4 dos domínios naturais A, B, C, D e/ou E, por exemplo, compreendem somente o domínio de SpA(A), mas não B a E, ou compreendem somente o domínio de SpA(D), mas não A, B, C ou E etc. Dessa forma, um antígeno spa útil com a invenção pode incluir 1, 2, 3, 4 ou 5 domínios de ligação de IgG, mas idealmente possui 4 ou menos. Se um antígeno inclui apenas um tipo de domínio de spa (por exemplo, apenas o domínio de

Spa(A) ou SpA(D)), ele pode incluir mais de uma cópia desse domínio, por exemplo, múltiplos domínios de SpA(D) em uma única cadeia polipeptídica. Um domínio individual dentro do antígeno pode ser mutado em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais aminoácidos em relação ao ID. DE SEQ. N°: 21 (por exemplo, veja a referência 241, que revela mutações nos resíduos 3 e/ou 24 do domínio D, nos resíduos 46 e/ou 53 do domínio A etc.). Esses mutantes não devem remover a habilidade do antígeno para despertar um anticorpo que reconhece o ID. DE SEQ. N°: 21, mas podem remover a ligação do antígeno à IgG. Em certos aspectos, um antígeno spa inclui uma substituição em: (a) uma ou mais substituições de aminoácidos em um subdomínio de ligação Fc de IgG do domínio de SpA A, B, C, D e/ou E que rompem ou diminuem a ligação ao Fc de IgG, e (b) uma ou mais substituições de aminoácidos em um subdomínio de ligação de V_H3 do domínio de SpA A, B, C, D e/ou E que rompem ou diminuem a ligação à VH3. Em certas modalidades, um SpA variante compreende pelo menos ou no máximo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais peptídeos variantes do domínio de SpA D.

esaC

O antígeno "esaC" é anotado como "esaC". Na cepa NCTC 8325, esaC é SAOUHSC_00264 e possui a seqüência de aminoácidos ID. DE SEQ. N°: 23 (GI: 88194069).

Antígenos esaC úteis podem despertar um anticorpo (por exemplo, quando administrados a um ser humano) que reconhece o ID. DE SEQ. N°: 23 e/ou podem compreender uma seqüência de aminoácidos: (a) que possui 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais)

para o ID. DE SEQ. N°: 23; e/ou (b) que compreende um fragmento de pelo menos "n" aminoácidos consecutivos do ID. DE SEQ. N°: 23, em que "n" é 7 ou mais (por exemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ou mais). Essas proteínas esaC incluem variantes do ID. DE SEQ. N°: 23. Fragmentos preferidos de (b) compreendem um epitopo do ID. DE SEQ. N°: 23. Outros fragmentos preferidos não possuem um ou mais aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou mais) do terminal C e/ou um ou mais aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou mais) do terminal N do ID. DE SEQ. N°: 23, embora retenham pelo menos um epitopo do ID. DE SEQ. N°: 23. Outros fragmentos omitem um ou mais domínios de proteína.

esxA

O antígeno "esxA" é anotado como "proteína". Na cepa NCTC 8325, esxA é SAOUHSC_00257 e possui a seqüência de aminoácidos ID. DE SEQ. N°: 24 (GI: 88194063).

Antígenos esxA úteis podem despertar um anticorpo (por exemplo, quando administrados a um ser humano) que reconhece o ID. DE SEQ. N°: 24 e/ou podem compreender uma seqüência de aminoácidos: (a) que possui 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) para o ID. DE SEQ. N°: 24; e/ou (b) que compreende um fragmento de pelo menos "n" aminoácidos consecutivos do ID. DE SEQ. N°: 24, em que "n" é 7 ou mais (por exemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ou mais). Essas proteínas esxA incluem variantes do ID. DE SEQ. N°: 24. Fragmentos preferidos de (b) compreendem um

epitopo do ID. DE SEQ. N°: 24. Outros fragmentos preferidos não possuem um ou mais aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou mais) do terminal C e/ou um ou mais aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou mais) do terminal N do ID. DE SEQ. N°: 24, embora retenham pelo menos um epitopo do ID. DE SEQ. N°: 24. Outros fragmentos omitem um ou mais domínios de proteína.

esxB

O antígeno "esxB" é anotado como "esxB". Na cepa NCTC 8325, esxB é SAOUHSC_00265 e possui a seqüência de aminoácidos ID. DE SEQ. N°: 25 (GI: 88194070).

Antígenos esxB úteis podem despertar um anticorpo (por exemplo, quando administrados a um ser humano) que reconhece o ID. DE SEQ. N°: 25 e/ou podem compreender uma seqüência de aminoácidos: (a) que possui 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) para o ID. DE SEQ. N°: 25; e/ou (b) que compreende um fragmento de pelo menos "n" aminoácidos consecutivos do ID. DE SEQ. N°: 25, em que "n" é 7 ou mais (por exemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ou mais). Essas proteínas esxB incluem variantes do ID. DE SEQ. N°: 25. Fragmentos preferidos de (b) compreendem um epitopo do ID. DE SEQ. N°: 25. Outros fragmentos preferidos não possuem um ou mais aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou mais) do terminal C e/ou um ou mais aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou mais) do terminal N do ID. DE SEQ. N°: 25, embora retenham pelo menos um epitopo do ID.

DE SEQ. N°: 25. Outros fragmentos omitem um ou mais domínios de proteína.

sta006

O antígeno "sta006" é anotado como "proteína de ligação de ferricromo", e foi citado como "FhuD2" na literatura [242]. Na cepa NCTC 8325, sta006 é SAOUHSC_02554 e possui a seqüência de aminoácidos ID. DE SEQ. N°: 26 (GI: 88196199). Na cepa Newman, ele é nwmn_2185 (GI: 151222397).

Antígenos sta006 úteis podem despertar um anticorpo (por exemplo, quando administrados a um ser humano) que reconhece o ID. DE SEQ. N°: 26 e/ou podem compreender uma seqüência de aminoácidos: (a) que possui 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) para o ID. DE SEQ. N°: 26; e/ou (b) que compreende um fragmento de pelo menos "n" aminoácidos consecutivos do ID. DE SEQ. N°: 26, em que "n" é 7 ou mais (por exemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 ou mais). Essas proteínas sta006 incluem variantes do ID. DE SEQ. N°: 26. Fragmentos preferidos de (b) compreendem um epitopo do ID. DE SEQ. N°: 26. Outros fragmentos preferidos não possuem um ou mais aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou mais) do terminal C e/ou um ou mais aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou mais) do terminal N do ID. DE SEQ. N°: 26, embora retenham pelo menos um epitopo do ID. DE SEQ. N°: 26. Os primeiros 17 aminoácidos do terminal N do ID. DE SEQ. N°: 26 normalmente podem ser omitidos. Outros fragmentos omitem um ou mais domínios de proteína. Formas mutantes de sta006 são

relatadas na referência 243. Um antígeno sta006 pode ser lipidado, por exemplo, com uma cisteína acilada do terminal N.

isdC

O antígeno "isdC" é anotado como "proteína". Na cepa NCTC 8325, isdC é SAOUHSC_01082 e possui a seqüência de aminoácidos ID. DE SEQ. N°: 27 (GI: 88194830).

Antígenos isdC úteis podem despertar um anticorpo (por exemplo, quando administrados a um ser humano) que reconhece o ID. DE SEQ. N°: 27 e/ou podem compreender uma seqüência de aminoácidos: (a) que possui 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) para o ID. DE SEQ. N°: 27; e/ou (b) que compreende um fragmento de pelo menos "n" aminoácidos consecutivos do ID. DE SEQ. N°: 27, em que "n" é 7 ou mais (por exemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200 ou mais). Essas proteínas isdC incluem variantes do ID. DE SEQ. N°: 27. Fragmentos preferidos de (b) compreendem um epitopo do ID. DE SEQ. N°: 27. Outros fragmentos preferidos não possuem um ou mais aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou mais) do terminal C e/ou um ou mais aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou mais) do terminal N do ID. DE SEQ. N°: 27, embora retenham pelo menos um epitopo do ID. DE SEQ. N°: 27. Os 39 aminoácidos finais do terminal C do ID. DE SEQ. N°: 27 normalmente podem ser omitidos. Os primeiros 28 aminoácidos do terminal N do ID. DE SEQ. N°: 27 normalmente podem ser omitidos. Outros fragmentos omitem um ou mais domínios de proteína.

Fragmentos úteis de IsdB são revelados na referência 249.

A referência 244 revela antígenos que normalmente incluem epitopos tanto de IsdB quanto de IsdH.

Hla

O antígeno "Hla" é o "precursor de alfa-hemolisina", também conhecido como "alfa toxina" ou simplesmente "hemolisina". Na cepa NCTC 8325, Hla é SAOUHSC_01121 e possui a seqüência de aminoácidos ID. DE SEQ. N°: 28 (GI: 88194865). Na cepa Newman, ele é nwmn_1073 (GI: 151221285). Hla é um determinante de virulência importante produzido pela maioria das cepas de *S. aureus*, que possuem atividade formadora de poros e hemolítica. Anticorpos anti-Hla podem neutralizar os efeitos prejudiciais da toxina em modelos animais, e Hla é particularmente útil para proteção contra pneumonia.

Antígenos Hla úteis podem despertar um anticorpo (por exemplo, quando administrados a um ser humano) que reconhece o ID. DE SEQ. N°: 28 e/ou podem compreender uma seqüência de aminoácidos: (a) que possui 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) para o ID. DE SEQ. N°: 28; e/ou (b) que compreende um fragmento de pelo menos "n" aminoácidos consecutivos do ID. DE SEQ. N°: 28, em que "n" é 7 ou mais (por exemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 ou mais). Essas proteínas Hla incluem variantes do ID. DE SEQ. N°: 28. Fragmentos preferidos de (b) compreendem um epitopo do ID. DE SEQ. N°: 28. Outros fragmentos preferidos não possuem um ou mais aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou

mais) do terminal C e/ou um ou mais aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou mais) do terminal N do ID. DE SEQ. N°: 28, embora retenham pelo menos um epitopo do ID. DE SEQ. N°: 28. Os primeiros 26 aminoácidos do terminal N do ID. DE SEQ. N°: 28 normalmente podem ser omitidos. O truncamento no terminal C também pode ser usado, por exemplo, deixando apenas 50 aminoácidos (resíduos 27-76 do ID. DE SEQ. N°: 28) [245]. Outros fragmentos omitem um ou mais domínios de proteína.

A toxicidade de Hlas pode ser evitada em composições da invenção por inativação química (por exemplo, com o uso de formaldeído, glutaraldeído ou outros reagentes de entrecruzamento). Em vez disso, no entanto, prefere-se usar formas mutantes de Hla que removem sua atividade toxica, enquanto retêm sua imunogenicidade. Esses mutantes detoxificados já são conhecidos na técnica. Um antígeno Hla útil possui uma mutação no resíduo 61 do ID. DE SEQ. N°: 28, que é o resíduo 35 do antígeno maduro (ou seja, após omissão dos primeiros 26 aminoácidos do terminal N). Dessa forma, o resíduo 61 pode não ser histidina, e pode ser, em vez disso, por exemplo, Ile, Val ou preferivelmente Leu. Uma mutação His-Arg nessa posição também pode ser usada. Por exemplo, o ID. DE SEQ. N°: 29 é a seqüência madura mutante Hla-H35L e um antígeno Hla útil compreende o ID. DE SEQ. N°: 29. Outra mutação útil substitui uma alça longa com uma seqüência curta, por exemplo, para substituir o 39mer nos resíduos 136-174 do ID. DE SEQ. N°: 28 com um tetrâmero como, por exemplo, PSGS (ID. DE SEQ. N°: 30), como no ID. DE SEQ. N°: 31 (que também inclui a mutação H35L) e no ID. DE SEQ. N°: 32 (que não inclui a mutação

H35L).

Antígenos Hla úteis adicionais são revelados nas referências 246 e 247.

Os IDS. DE SEQ. N^{os}: 33, 34 e 35 são três fragmentos úteis do ID. DE SEQ. N°: 28 ("Hla_{27-76}", "Hla_{27-89}" e "Hla_{27-79}", respectivamente). Os IDS. DE SEQ. N^{os}: 36, 37 e 38 são os fragmentos correspondentes do ID. DE SEQ. N°: 29.

sta011

O antígeno "sta011" é anotado como "lipoproteína". Na cepa NCTC 8325, sta011 é SAOUHSC_00052 e possui a seqüência de aminoácidos ID. DE SEQ. N°: 39 (GI: 88193872).

Antígenos sta011 úteis podem despertar um anticorpo (por exemplo, quando administrados a um ser humano) que reconhece o ID. DE SEQ. N°: 39 e/ou podem compreender uma seqüência de aminoácidos: (a) que possui 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) para o ID. DE SEQ. N°: 39; e/ou (b) que compreende um fragmento de pelo menos "n" aminoácidos consecutivos do ID. DE SEQ. N°: 39, em que "n" é 7 ou mais (por exemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 ou mais). Essas proteínas sta011 incluem variantes do ID. DE SEQ. N°: 39. Fragmentos preferidos de (b) compreendem um epitopo do ID. DE SEQ. N°: 39. Outros fragmentos preferidos não possuem um ou mais aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou mais) do terminal C e/ou um ou mais aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou mais) do terminal N do ID. DE SEQ. N°: 39, embora retenham pelo menos um epitopo do ID. DE SEQ. N°: 39. Os primeiros 23

aminoácidos do terminal N do ID. DE SEQ. N°: 39 normalmente podem ser omitidos. Outros fragmentos omitem um ou mais domínios de proteína. Um antígeno sta006 pode ser lipidado, por exemplo, com uma cisteína acilada do terminal N.

Formas variantes do ID. DE SEQ. N°: 39 que podem ser usadas para a preparação de antígenos sta011 incluem, sem limitação, os IDS. DE SEQ. N^{os}: 40, 41 e 42 com várias substituições de Ile/Val/Leu.

isdA

O antígeno "isdA" é anotado como "proteína IsdA". Na cepa NCTC 8325, isdA é SAOUHSC_01081 e possui a seqüência de aminoácidos ID. DE SEQ. N°: 43 (GI: 88194829). Na cepa Newman, ele é nwmn_1041 (GI: 151221253).

Antígenos isdA úteis podem despertar um anticorpo (por exemplo, quando administrados a um ser humano) que reconhece o ID. DE SEQ. N°: 43 e/ou podem compreender uma seqüência de aminoácidos: (a) que possui 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) para o ID. DE SEQ. N°: 43; e/ou (b) que compreende um fragmento de pelo menos "n" aminoácidos consecutivos do ID. DE SEQ. N°: 43, em que "n" é 7 ou mais (por exemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 ou mais). Essas proteínas isdA incluem variantes do ID. DE SEQ. N°: 43. Fragmentos preferidos de (b) compreendem um epitopo do ID. DE SEQ. N°: 43. Outros fragmentos preferidos não possuem um ou mais aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou mais) do terminal C e/ou um ou mais aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou mais)

do terminal N do ID. DE SEQ. N°: 43, embora retenham pelo menos um epitopo do ID. DE SEQ. N°: 43. Os 38 aminoácidos finais do terminal C do ID. DE SEQ. N°: 43 normalmente podem ser omitidos. Os primeiros 46 aminoácidos do terminal N do ID. DE SEQ. N°: 43 normalmente podem ser omitidos. O truncamento para excluir o 38mer do terminal C do ID. DE SEQ. N°: 43 (que começa com o motivo LPKTG) também é útil. Outros fragmentos omitem um ou mais domínios de proteína.

O ID. DE SEQ. N°: 44 é um fragmento útil do ID. DE SEQ. N°: 43 (aminoácidos 40-184 do ID. DE SEQ. N°: 43; "$IsdA_{40-184}$"), que inclui o sítio de ligação de heme natural da proteína e inclui o domínio mais exposto do antígeno. Ele também reduz a similaridade do antígeno com proteínas humanas. Outros fragmentos úteis são revelados nas referências 248 e 249.

IsdA não adsorve bem no adjuvantes de hidróxido de alumínio e, portanto, IsdA presente em uma composição pode não ser adsorvido ou pode ser adsorvido a um adjuvante alternativo, por exemplo, a um fosfato de alumínio.

isdB

O antígeno "isdB" é anotado como "proteína do neurofilamento isdB". Na cepa NCTC 8325, isdB é SAOUHSC_01079 e possui a seqüência de aminoácidos ID. DE SEQ. N°: 45 (GI: 88194828). IsdB foi proposto para uso como um antígeno de vacina por ele próprio [250], mas isso pode não evitar pneumonia.

Antígenos isdB úteis podem despertar um anticorpo (por exemplo, quando administrados a um ser humano) que reconhece o ID. DE SEQ. N°: 45 e/ou podem compreender uma seqüência de aminoácidos: (a) que possui 50% ou mais de

identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) para o ID. DE SEQ. N°: 45; e/ou (b) que compreende um fragmento de pelo menos "n" aminoácidos consecutivos do ID. DE SEQ. N°: 45, em que "n" é 7 ou mais (por exemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 ou mais). Essas proteínas isdB incluem variantes do ID. DE SEQ. N°: 45. Fragmentos preferidos de (b) compreendem um epitopo do ID. DE SEQ. N°: 45. Outros fragmentos preferidos não possuem um ou mais aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou mais) do terminal C e/ou um ou mais aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou mais) do terminal N do ID. DE SEQ. N°: 45, embora retenham pelo menos um epitopo do ID. DE SEQ. N°: 45. The final 36 aminoácidos do terminal C do ID. DE SEQ. N°: 45 normalmente podem ser omitidos. Os primeiros 40 aminoácidos do terminal N do ID. DE SEQ. N°: 45 normalmente podem ser omitidos. Outros fragmentos omitem um ou mais domínios de proteína. Fragmentos úteis de IsdB são revelados nas referências 249 e 251, por exemplo, que não possuem 37 aminoácidos internos do ID. DE SEQ. N°: 45.

Em algumas modalidades, as composições da invenção não incluem um antígeno isdB.

sta073

O antígeno "sta073" é anotado como "precursor de autolisina bifuncional". Na cepa NCTC 8325, sta073 é SAOUHSC_00994 e possui a seqüência de aminoácidos ID. DE SEQ. N°: 46 (GI: 88194750). Na cepa Newman, ele é nwmn_0922 (GI: 151221134). A análise proteômica revelou que essa

proteína é secretada ou exposta na superfície.

Antígenos sta073 úteis podem despertar um anticorpo (por exemplo, quando administrados a um ser humano) que reconhece o ID. DE SEQ. N°: 46 e/ou podem compreender uma seqüência de aminoácidos: (a) que possui 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) para o ID. DE SEQ. N°: 46; e/ou (b) que compreende um fragmento de pelo menos "n" aminoácidos consecutivos do ID. DE SEQ. N°: 46, em que "n" é 7 ou mais (por exemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 ou mais). Essas proteínas sta073 incluem variantes do ID. DE SEQ. N°: 46. Fragmentos preferidos de (b) compreendem um epitopo do ID. DE SEQ. N°: 46. Outros fragmentos preferidos não possuem um ou mais aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou mais) do terminal C e/ou um ou mais aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou mais) do terminal N do ID. DE SEQ. N°: 46, embora retenham pelo menos um epitopo do ID. DE SEQ. N°: 46. Os primeiros 24 aminoácidos do terminal N do ID. DE SEQ. N°: 46 normalmente podem ser omitidos. Outros fragmentos omitem um ou mais domínios de proteína.

Sta073 não adsorve bem em adjuvantes de hidróxido de alumínio e, portanto, Sta073 presente em uma composição pode não ser adsorvido ou pode ser adsorvido a um adjuvante alternativo, por exemplo, a um fosfato de alumínio.

Polipeptídeos híbridos

Os antígenos protéicos de *S. aureus* usados na invenção podem estar presentes na composição como polipeptídeos

separados individuais. Quando mais de um antígeno é usado, no entanto, eles não precisam estar presentes como polipeptídeos separados. Em vez disso, pelo menos dois (por exemplo, 2, 3, 4, 5 ou mais) antígenos podem ser expressos como uma cadeia polipeptídica única (um polipeptídeo "híbrido"). Polipeptídeos híbridos oferecem duas vantagens principais: primeiro, um polipeptídeo que pode ser instável ou pouco expresso por ele próprio pode ser auxiliado por adição de um parceiro híbrido que supera o problema; segundo, a fabricação comercial é simplificada, na medida em que apenas uma expressão e purificação precisa ser empregada a fim de produzir dois polipeptídeos que são, ambos, antigenicamente úteis.

O polipeptídeo híbrido pode compreender duas ou mais seqüências polipeptídicas de cada um dos antígenos listados acima, ou duas ou mais variantes do mesmo antígeno, nos casos em que a seqüência possui variabilidade parcial através de cepas.

Híbridos que consistem em seqüências de aminoácidos de dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove ou dez antígenos são úteis. Em particular, híbridos que consistem em seqüências de aminoácidos de dois, três, quatro ou cinco antígenos são preferidos, por exemplo, dois ou três antígenos.

Polipeptídeos híbridos diferentes podem ser misturados juntos em uma única formulação. Híbridos podem ser combinados com antígenos não híbridos selecionados do primeiro, segundo ou terceiro grupos de antígenos. Dentro dessas combinações, um antígeno pode estar presente em mais de um polipeptídeo híbrido e/ou como um polipeptídeo não

híbrido. Prefere-se, no entanto, que um antígeno esteja presente como um híbrido ou como um não híbrido, mas não como ambos.

Polipeptídeos híbridos podem ser representados pela fórmula NH_2-A-{-X-L-}$_n$-B-COOH, em que: X é uma seqüência de aminoácidos de um antígeno de *S. aureus*, como descrito acima; L é uma seqüência de aminoácidos vinculadora opcional; A é uma seqüência de aminoácidos do terminal N opcional; B é uma seqüência de aminoácidos do terminal C opcional; *n* é um número inteiro de 2 ou mais (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6 etc.). Normalmente, *n* é 2 ou 3.

Se uma porção -X- possui uma seqüência de peptídeo-líder em sua forma do tipo selvagem, esta pode ser incluída ou omitida na proteína híbrida. Em algumas modalidades, os peptídeos-líderes serão deletados para que a porção -X- localizada no terminal N da proteína híbrida, ou seja, o peptídeo-líder de X_1, seja retida, mas os peptídeos-líderes de X_2 ... X_n sejam omitidos. Isso é equivalente à deleção de todos os peptídeos-líderes e à utilização do peptídeo-líder de X_1 como porção -A-.

Para cada *n* casos de {-X-L-}, a seqüência de aminoácidos vinculadora -L- pode estar presente ou ausente. Por exemplo, quando *n* = 2, o híbrido pode ser NH_2-X_1-L_1-X_2-L_2-COOH, NH_2-X_1-X_2-COOH, NH_2-X_1-L_1-X_2-COOH, NH_2-X_1-X_2-L_2-COOH etc. Seqüência(s) de aminoácidos(s) vinculadoras -L- tipicamente serão curtas (por exemplo, 20 ou menos aminoácidos, ou seja, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Exemplos compreendem seqüências peptídicas curtas que facilitam a clonagem, vinculadores de poliglicina (ou seja, que compreendem Gly_n,

em que *n* = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais), e *tags* de histidina (ou seja, His_n, em que *n* = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais). Outras seqüências de aminoácidos vinculadoras adequadas serão evidentes para aqueles habilitados na técnica. Um vinculador útil é GSGGGG (ID. DE SEQ. N°: 47) ou GSGSGGGG (ID. DE SEQ. N°: 48), com o dipeptídeo Gly-Ser sendo formado por um sítio de restrição *Bam*HI auxiliando, dessa forma, a clonagem e manipulação, e o tetrapeptídeo $(Gly)_4$ sendo um vinculador de poliglicina típico. Outros vinculadores adequados, particularmente para uso como o L_n final, são ASGGGS (ID. DE SEQ. N°: 49, por exemplo, codificado pelo ID. DE SEQ. N°: 50), ou um dipeptídeo Leu-Glu.

-A- é uma seqüência de aminoácidos do terminal N opcional. Esta será tipicamente curta (por exemplo, 40 ou menos aminoácidos, ou seja, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Exemplos incluem seqüências-líderes para dirigir o tráfego de proteína, ou seqüências peptídicas curtas que facilitam a clonagem ou purificação (por exemplo, *tags* de histidina, ou seja, His_n, em que *n* = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais). Outras seqüências de aminoácidos do terminal N adequadas serão evidentes para aqueles habilitados na técnica. Se X_1 não possui sua própria metionina do terminal N, -A- é preferivelmente um oligopeptídeo (por exemplo, com 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 aminoácidos) que fornece uma metionina do terminal N, por exemplo, Met-Ala-Ser, ou um único resíduo Met.

-B- é uma seqüência de aminoácidos do terminal C

opcional. Esta será tipicamente curta (por exemplo, 40 ou menos aminoácidos, ou seja, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Exemplos incluem seqüências para dirigir o tráfego de proteína, seqüências peptídicas curtas que facilitam a clonagem ou purificação (por exemplo, que compreendem *tags* de histidina, ou seja, His_n, em que n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais, por exemplo, o ID. DE SEQ. N°: 51), ou seqüências que aumentam a estabilidade da proteína. Outras seqüências de aminoácidos do terminal C adequadas serão evidentes para aqueles habilitados na técnica.

Um polipeptídeo híbrido da invenção pode incluir tanto antígenos EsxA quanto antígenos EsxB. Estes podem estar em qualquer ordem, do terminal N para o C. Os IDS. DE SEQ. N^{OS}: 52 ("EsxAB"; codificado pelo ID. DE SEQ. N°: 53) e 54 ("EsxBA") são exemplos desses híbridos, ambos possuindo vinculadores hexapeptídicos ASGGGS (ID. DE SEQ. N°: 49).

Geral

A prática da presente invenção irá empregar, a menos que indicado de forma diferente, métodos convencionais de química, bioquímica, biologia molecular, imunologia e farmacologia, dentro dos conhecimentos da técnica. Essas técnicas são explicadas totalmente na literatura. Veja, por exemplo, as referências 252-259 etc.

A numeração "GI" é usada acima. Um número GI, ou "Identificador GenInfo", é uma série de dígitos atribuídos consecutivamente a cada registro de seqüência processado pelo NCBI quando são adicionadas seqüências às suas bases de dados. O número GI não se assemelha ao número de acesso

do registro da seqüência. Quando uma seqüência é atualizada (por exemplo, para correção ou para adicionar mais anotação ou informação), ela então recebe um novo número GI. Dessa forma, a seqüência associada a certo número GI nunca é alterada.

Referências a uma percentagem de identidade de seqüência entre duas seqüências de aminoácidos significam que, quando alinhadas, aquela percentagem de aminoácidos é igual na comparação das duas seqüências. Esse alinhamento, e a homologia ou identidade percentual de seqüências, podem ser determinados com o uso de programas de computador conhecidos na técnica, por exemplo, aqueles descritos na seção 7.7.18 da referência 260. Um alinhamento preferido é determinado pelo algoritmo de pesquisa de homologia de Smith-Waterman com o uso de uma pesquisa de lacunas (*gaps*) afins com uma penalidade de lacuna aberta de 12 e uma penalidade de extensão de lacuna de 2, matriz BLOSUM de 62. O algoritmo de pesquisa de homologia de Smith-Waterman é revelado na referência 261.

Quando a invenção se refere a um "epitopo", esse epitopo pode ser um epitopo de célula B e/ou um epitopo de célula T. Esses epitopos podem ser identificados empiricamente (por exemplo, com o uso de PEPSCAN [262, 263] ou métodos similares), ou podem ser previstos (por exemplo, com o uso do índice antigênico de Jameson-Wolf [264], abordagens à base de matriz [265], MAPITOPE [266], TEPITOPE [267, 268], redes neurais [269], OptiMer e EpiMer [270, 271], ADEPT [272], Tsites [273], hidrofilia [274], índice antigênico [275] ou os métodos revelados nas referências 276-280 etc.). Epitopos são as partes de um antígeno que

são reconhecidas e se ligam aos sítios de ligação de antígeno de anticorpos ou receptores de célula T, e também podem ser citados como "determinantes antigênicos".

Quando um "domínio" de antígeno é omitido, isso pode envolver a omissão de um peptídeo sinalizador, de um domínio citoplasmático, de um domínio transmembrana, de um domínio extracelular etc.

O termo "que compreende" engloba "que inclui", bem como "que consiste"; por exemplo, uma composição "que compreende" X pode consistir exclusivamente em X ou pode incluir algo adicional, por exemplo, X + Y.

O termo "cerca de", em relação a um valor numérico *x*, significa, por exemplo, $x \pm 10\%$.

A palavra "substancialmente" não exclui "completamente"; por exemplo, uma composição que é "substancialmente livre" de Y pode ser completamente livre de Y. Quando necessário, a palavra "substancialmente" pode ser omitida da definição da invenção.

Quando a invenção fornece um processo que envolve múltiplas etapas seqüenciais, a invenção também pode fornecer um processo que envolve menos do que o número total de etapas. Por exemplo, a invenção fornece um processo que compreende as etapas de: (a) despolimerização de um polissacarídeo capsular de *S. aureus* tipo 5 ou tipo 8, para gerar um fragmento de polissacarídeo; e (b) oxidação do fragmento a fim de introduzir um grupo aldeído em pelo menos um resíduo sacarídico no fragmento, para gerar um resíduo sacarídico oxidado. A etapa adicional (c) não precisa ser realizada a fim de ser englobada pelo escopo da invenção, na medida em que o produto das etapas

(a) e (b) possui utilidade como um intermediário na preparação do conjugado, e pode ser usado, armazenado, exportado etc. para um uso separado e posterior. Esse uso posterior envolve a realização da etapa (c). Alternativamente, o produto das etapas (a) e (b) pode ser acoplado a uma molécula de transporte de uma forma diferente, por exemplo, por meio de um grupo hidroxil ou carboxil que é retido no resíduo sacarídico oxidado.

Similarmente, quando um material polissacarídico de partida já está parcialmente processado, então a invenção engloba processos que envolvem somente as etapas posteriores de um método. Por exemplo, a invenção engloba um processo que compreende uma etapa de acoplamento de um resíduo sacarídico oxidado em um polissacarídeo capsular do tipo 5 ou do tipo 8 a uma molécula de transporte por meio de um grupo aldeído, em que o material de partida para o processo é um polissacarídeo capsular do tipo 5 ou do tipo 8 que foi previamente despolimerizado para gerar um fragmento de polissacarídeo e depois oxidado para introduzir o grupo aldeído no resíduo sacarídico.

Essas etapas diferentes podem ser realizadas em momentos muito diferentes por pessoas diferentes em lugares diferentes (por exemplo, em países diferentes).

Será observado que anéis de açúcar podem existir em forma aberta e fechada e que, enquanto formas fechadas são aqui mostradas em fórmulas estruturais, as formas abertas também são englobadas pela invenção. Similarmente, será observado que açúcares podem existir em formas de piranose e furanose e que, enquanto formas de piranose são aqui mostradas em fórmulas estruturais, as formas de furanose

também são englobadas. Formas anoméricas diferentes de açúcares também são englobadas.

Uma amina primária pode ser representada pela fórmula NH. O grupo R tipicamente será um doador de elétrons, e inclui C_{1-8} hidrocarbil, particularmente C_{1-8} alquil, especialmente metil. R é freqüentemente $-CH_3$, $-C_2H_5$ ou $-C_3H_7$. O hidrocarbil pode ser substituído com um ou mais grupos, tais como: halogênio (por exemplo, Cl, Br, F, I), trihalometil, $-NO_2$, -CN, $-N^+(C_{1-6}$ alquil$)_2O-$, $-SO_3H$, $-SOC_{1-6}$ alquil, $-SO_2C_{1-6}$ alquil, $-SO_3C_{1-6}$ alquil, $-OC(=O)OC_{1-6}$ alquil, $-C(=O)H$, $-C(=O)C_{1-6}$ alquil, $-OC(=O)C_{1-6}$ alquil, $-N(C_{1-6}$ alquil$)_2$, $-C_{1-6}$ alquil, $-N(C_{1-6}$ alquil$)_2$, $-C(=O)N(C_{1-6}$ alquil$)_2$, $-N(C_{1-6}$ alquil$)C(=O)O(C_{1-6}$ alquil), $-N(C_{1-6}$ alquil$)C(=O)N(C_{1-6}$ alquil$)_2$, $-CO_2H$, $-OC(=O)N(C_{1-6}$ alquil$)_2$, $-N(C_{1-6}$ alquil$)C(=O)C_{1-6}$ alquil, $N(C_{1-6}$ alquil$)C(=S)C_{1-6}$ alquil, $-N(C_{1-6}$ alquil$)SO_2N(C_{1-6}$ alquil$)_2$, $-CO_2C_{1-6}$ alquil, $-SO_2N(C_{1-6}$ alquil$)_2$, $-C(=O)NH_2$, $-C(=S)N(C_{1-6}$ alquil$)_2$, $-N(C_{1-6}$ alquil$)SO_2C_{1-6}$ alquil, $-N(C_{1-6}$ alquil$)C(=S)N(C_{1-6}$ alquil$)_2$, -NH C_{1-6} alquil, $-S-C_{1-6}$ alquil ou $-O-C_{1-6}$ alquil. O termo "hidrocarbil" inclui grupos monovalentes lineares, ramificados ou cíclicos que consistem em carbono e hidrogênio. Dessa forma, grupos hidrocarbil incluem grupos alquil, alquenil e alquinil, grupos cicloalquil (incluindo policicloalquil), cicloalquenil e aril, e combinações destes, por exemplo, grupos alquilcicloalquil, alquilpolicicloalquil, alquilaril, alquenilaril, cicloalquilaril, cicloalquenilaril, cicloalquilalquil, policicloalquilalquil, arilalquil, arilalquenil, arilcicloalquil e arilcicloalquenil. Hidrocarbis típicos são C_{1-14} hidrocarbil, mais particularmente, C_{1-8}

hidrocarbil.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 mostra um esquema para a produção de um conjugado de polissacarídeo capsular de *S. aureus* do tipo 5-CRM197 usando um vinculador de diidrazina de ácido adípico e química de carbodiimida.

A Figura 2a mostra uma análise de SDS-PAGE do conjugado de polissacarídeo capsular de *S. aureus* do tipo 5-CRM197 feito com o uso de um vinculador de diidrazina de ácido adípico e química de carbodiimida. A Figura 2b mostra um cromatograma de S300 Sephacryl™ do conjugado de polissacarídeo capsular de *S. aureus* do tipo 5-CRM197 feito com o uso de um vinculador de diidrazina de ácido adípico e química de carbodiimida.

A Figura 3 mostra um cromatograma de S300 Sephacryl™ de polissacarídeo capsular do tipo 5 despolimerizado.

A Figura 4A compara sinais de 1D ^{1}H na região anomérica ^{1}H para polissacarídeo capsular do tipo 5 despolimerizado e nativo. Algumas diferenças notáveis estão marcadas. As Figuras 4B e 4C comparam as regiões anoméricas e de metil-fucose, respectivamente, de espectros de acoplamento escalar 2D (^{1}H, ^{1}H) para esses polissacarídeos. Algumas diferenças notáveis estão marcadas.

A Figura 5a mostra uma análise de SDS-PAGE de um conjugado de polissacarídeo capsular de *S. aureus* do tipo 5-CRM197 feito com o uso de um método da invenção. A Figura 5b mostra um cromatograma de S300 Sephacryl™ de um conjugado de polissacarídeo capsular de *S. aureus* do tipo 5-CRM197 feito com o uso de um método da invenção.

A Figura 6 mostra um cromatograma de S300 Sephacryl™

de polissacarídeos capsulares de *S. aureus* do tipo 5 despolimerizados sob várias condições.

A Figura 7 mostra análises de SDS-PAGE de conjugados de polissacarídeo capsular de *S. aureus* do tipo 5-CRM197 feitos com o uso de métodos da invenção.

A Figura 8 mostra a resposta de IgG a vários antígenos em um modelo de abscesso renal em camundongo de infecção por *S. aureus*.

A Figura 9 compara respostas de IgG e IgM a vários antígenos no modelo de abscesso renal em camundongo.

A Figura 10 mostra respostas protetoras a vários antígenos no modelo de abscesso renal em camundongo.

A Figura 11 compara a resposta de IgG a diferentes conjugados no modelo de abscesso renal em camundongo.

A Figura 12 compara respostas protetoras a diferentes conjugados no modelo de abscesso renal em camundongo.

As Figuras 13A e 13B comparam respostas protetoras a conjugados adicionais no modelo de abscesso renal em camundongo.

A Figura 14 compara respostas de IgG e IgM a conjugados adicionais no modelo de abscesso renal em camundongo.

A Figura 15 compara respostas protetoras a um conjugado adicional quando tendo como adjuvantes diferentes agentes no modelo de abscesso renal em camundongo.

A Figura 16 compara respostas a vários antígenos em um modelo de infecção letal por *S. aureus* em camundongo.

A Figura 17 mostra um cromatograma de SEC-HPLC de polissacarídeo capsular de *S. aureus* do tipo 8 despolimerizado com 2 M de ácido clorídrico.

A Figura 18 mostra um espectro de RNM de polissacarídeo capsular de *S. aureus* do tipo 8 despolimerizado com 2 M de ácido clorídrico.

MODOS PARA REALIZAÇÃO DA INVENÇÃO

Produção e caracterização do conjugado

Um polissacarídeo capsular de *S. aureus* do tipo 5 purificado foi conjugado a CRM197 usando química de carbodiimida e um vinculador de diidrazina de ácido adípico, similar ao método usado na referência 2 (veja abaixo). Nesse método, o polissacarídeo capsular é conjugado a CRM197 derivatizado usando EDC (Figura 1). A reação envolve os grupos carboxil do polissacarídeo capsular. A carbodiimida (EDC) ativa os grupos carboxil para se ligarem ao grupo $-NH_2$ da proteína de transporte derivatizada (CRMadh), formando uma ligação amida. A CRMadh derivatizada é preparada usando a mesma química de carbodiimida.

Preparação de CRMadh:

A uma solução de CRM197, foram adicionados 100 mM de tampão MES pH 6,0 a fim de alcançar uma concentração final de 10-12 mg/ml. A seguir, 3,5 mg/ml de ADH (diidrazida de ácido adípico) e 0,15 (EDC/CRM, p/p) foram adicionados, e a reação mantida sob agitação suave por 1 hora em temperatura ambiente. A mistura foi então dialisada primeiro contra 200 mM de NaCl, 10 mM de tampão MES pH 7,3, e depois contra 5 mM de tampão MES pH 7,0, usando uma membrana de 6-8 kDa (SpectraPor). O produto foi caracterizado por MicroBCA, SDS-Page (3-8%), HPLC e MS. Constatou-se que a CRMadh estava derivatizada com 6-8 de vinculador de ADH).

Reação de conjugação:

A reação de conjugação foi realizada em uma concentração de polissacarídeo capsular de 2 mg/ml em 50 mM de tampão MES pH 6,04. A proteína de transporte derivatizada, CRMadh, foi adicionada à solução de polissacarídeo capsular até uma concentração final de 4,0 mg/ml. A solução foi mantida em temperatura ambiente por 3 horas. A proporção de polissacarídeo:proteína na mistura de reação era de 1:2 (peso/peso), a proporção de polissacarídeo:EDC era de 1:6,66 (equivalente/equivalente), e a proporção de polissacarídeo:SulfoNHS era de 1:0,53 (equivalente/equivalente).

Após 3 horas, a formação do conjugado foi verificada por SDS-PAGE usando um gel de NuPAGE® 3-8% Tris-Acetato (Invitrogen) (Figura 2a). Após conjugação, o conjugado foi purificado por cromatografia por filtração em gel (realizada em um sistema Akta™ (G&E Healthcare) usando uma resina S300 Sephacryl™ (G&E Healthcare), com um tampão de fase móvel de 10 mM de NaPi, 10 mM de NaCl, pH 7,2). O conjugado foi detectado a 215 nm, 254 nm e 280 nm (Figura 2b). A solução de conjugado foi armazenada a -20°C até uso posterior. O teor de sacarídeo total no conjugado foi determinado por análise de HPAEC-PAD e o teor de proteína pelo ensaio MicroBCA, como descrito na referência 281 (Tabela 1).

Conjugado (lote)	Proteína (µg/ml)	Sacarídeo (µg/ml)	Sacarídeo/proteína (p/p)
1	26,00	12,10	0,47
2	33,90	11,00	0,32
3	62,21	29,40	0,47
4	45,21	9,30	0,21

TABELA 1

Polissacarídeos capsulares de *S. aureus* do tipo 5 e do tipo 8 purificados foram conjugados separadamente a CRM197 usando um método da invenção (veja abaixo).

Despolimerização

O polissacarídeo capsular purificado foi dissolvido em água destilada a 2 mg/ml. Ácido acético foi adicionado até uma concentração final de 2% (v/v) e a reação mantida a 90°C por 3 horas (ou de um dia para o outro, no caso do Lote B). A solução foi então neutralizada com 1 M de NaOH e o polissacarídeo despolimerizado purificado em uma coluna de filtração em gel (realizada em um sistema Akta™ (G&E Healthcare) usando uma resina S300 Sephacryl™ (G&E Healthcare), com um tampão de fase móvel de 10 mM de NaPi, 10 mM de NaCl, pH 7,2). O sacarídeo foi detectado a 215 nm (Figura 3). Frações reunidas em pool foram dialisadas contra água destilada usando uma membrana de 1 kDa (SpectraPor) e liofilizadas.

O local da clivagem foi verificado como sendo em ligações glicosídicas (1→3) dentro do polissacarídeo do tipo 5 usando ^{1}H-RNM. Resumidamente, amostras de polissacarídeo capsular do tipo 5 nativo e despolimerizado foram liofilizadas para eliminar solvente protonado por água e dissolvidas em óxido de deutério (deutério 99,9%, Sigma-Aldrich). Todos os espectros de RNM foram registrados a 50°C em um espectrômetro Bruker Avance III 400 MHz usando uma sonda de banda ampla de 5 mm e o pacote de programas TopSpin 2.1 (Bruker) para aquisição e processamento de dados. Os espectros de 1D ^{1}H foram coletados usando um experimento-padrão de um pulso sobre uma largura espectral

de 4.000 Hz e coletando pontos de dados de 32 k. O transmissor foi ajustado na freqüência de HDO residual (4,79 ppm). Os espectros foram obtidos de forma quantitativa usando um tempo de reciclagem total para assegurar a recuperação plena de cada sinal (5x Tempo de Relaxamento Longitudinal T1). Os espectros foram transformados por Fourier após aplicação de uma função de alargamento de linha de 0,2 Hz. Os espectros de correlação escalar 2D (^1H, ^1H) foram registrados por seqüência de pulso DQF-COSY. 4.096 pontos de dados foram coletados no domínio F2 e 256 no domínio F1.

Os sinais de 1D ^1H para o polissacarídeo nativo foram comparados com valores publicados e foi constatado que estavam de acordo (Tabela 2).

Sinal	δ medido (ppm)*	δ publicado (ppm)**	δ publicado (ppm)***
$H_3^{L\text{-}FucNAc\text{-}OAc}$	4,958	5,005	5,005
$H_1^{L\text{-}FucNAc\text{-}OAc}$	4,929	4,981	4,975
$H_3^{L\text{-}FucNAc\text{-}deOAc}$	4,864	4,935	4,911
$H_1^{ManNAc\text{-}deOAc}$	4,801	4,860	4,847
$H_1^{ManNAc\text{-}OAc}$	4,638	4,698	4,683
$H_2^{ManNAc\text{-}deOAc}$	4,625	4,680	4,670
$H_2^{ManNAc\text{-}deOAc}$	4,584	4,645	4,629
$H_1^{D\text{-}FucNAc\text{-}OAc/deOAc}$	4,405	4,461	4,452
$H_4^{L\text{-}FucNAc\text{-}OAc}$	4,320	4,382	4,367
$H_2^{L\text{-}FucNAc\text{-}OAc}$	4,292	4,368	4,338
$H_5^{L\text{-}FucNAc\text{-}OAc}$	4,121	4,175	4,168
$H_5^{L\text{-}FucNAc\text{-}deOAc}$	4,080	4,142	4,126
$H_2^{L\text{-}FucNAc\text{-}deOAc}$	4,033	4,105	4,077

$H_4^{L\text{-}FucNAc\text{-}deOAc}$	4,005	4,060	4,051
$NAc^{D\text{-}FucNAc\text{-}OAc}$	2,083	2,149	2,131
$NAc^{D\text{-}FucNAc\text{-}deOAc}$	2,067	2,126	2,115
$OAc^{L\text{-}FucNAc\text{-}OAc}$	2,004	2,070	2,051
$NAc^{L\text{-}FucNAc\text{-}deOAc}$	1,995	2,,057	2,002
$NAc^{L\text{-}FucNAc\text{-}OAc}$	1,955	2,023	2,043
$NAc^{ManNAc\text{-}deOAc}$	1,948	2,018	1,996
$NAc^{ManNAc\text{-}OAc}$	1,943	2,011	1,992
$H_6^{D\text{-}FucNAc\text{-}OAc}$	1,238	1,300	1,287
$H_6^{D\text{-}FucNAc\text{-}deOAc}$		1,298	
$H_6^{L\text{-}FucNAc\text{-}OAc/deOAc}$	1,183	1,242	1,231

* sinal de HDO a 4,484 ppm.

** Jones C. *Carbohydr. Res.* 2005, 340(6), 1.097-1.106 - sinal de HDO a 4,484 ppm.

*** Jones C. *Carbohydr. Res.* 2005, 340(6), 1.097-1.106 - H1L-FucNAc = 5,005 ppm, portanto, sinal de HDO a 4,532 ppm ao invés de 4,484 ppm.

TABELA 2

A Figura 4A compara sinais 1D ^1H na região anomérica ^1H para os polissacarídeos despolimerizados e nativos. As Figuras 4B e 4C comparam as regiões anoméricas e de metil-fucose, respectivamente, de espectros de acoplamento escalar 2D (^1H, ^1H) para esses polissacarídeos. Os dados mostram que o tratamento com ácido acético resultou em clivagem de ligações glicosídicas (1→3) entre os resíduos de α-L-FucNAc(3OAc) e β-D-FucNAc no polissacarídeo capsular do tipo 5.

Oxidação

O polissacarídeo capsular despolimerizado foi

dissolvido em água destilada a 2 mg/ml. $NaIO_4$ foi adicionado em uma proporção de polissacarídeo:$NaIO_4$ de 1:1 (peso/peso) e a reação foi mantida em temperatura ambiente por 1-2 horas no escuro. A solução foi então dialisada contra água destilada usando uma membrana de 1 kDa (SpectraPor) e liofilizada mais uma vez.

Conjugação

O polissacarídeo capsular oxidado foi dissolvido em um tampão de 200 mM de NaPi, 1 M de NaCl, pH 7,2, em uma concentração de 10 mg/ml. CRM197 foi adicionado à solução em uma proporção de polissacarídeo:proteína de 4:1 (peso/peso) e $NaBH_3CN$ (Aldrich) adicionado em uma proporção de sacarídeo:$NaBCNH_3$ de 2:1 (peso/peso). A solução foi mantida a 37°C por 2 dias. SDS-PAGE foi usada para confirmar a formação do conjugado (veja a Figura 5a para o conjugado do tipo 5). Após conjugação, o conjugado foi purificado por cromatografia por filtração em gel (realizada em um sistema Akta™ (G&E Healthcare) usando uma resina S300 Sephacryl™ (G&E Healthcare), com um tampão de fase móvel de 10 mM de NaPi, 10 mM de NaCl, pH 7,2). O conjugado foi detectado a 215 nm, 254 nm e 280 nm (veja a Figura 5b para o conjugado do tipo 5). A solução de conjugado foi armazenada a -20°C até uso posterior. O teor de sacarídeo total no conjugado foi determinado por análise de HPAEC-PAD e o teor de proteína pelo ensaio MicroBCA (veja Tabela 3a para o conjugado do tipo 5 e Tabela 3b para o conjugado do tipo 8).

Conjugado (lote)	**Proteína (µg/ml)**	**Sacarídeo (µg/ml)**	**Sacarídeo/proteína (p/p)**
A	51,52	1,72	0,03

B	161,80	17,10	0,11
C	34,42	4,22	0,12
D	40,56	12,70	0,31
E	196,00	55,17	0,28

TABELA 3a

Conjugado (lote)	Proteína (µg/ml)	Sacarídeo (µg/ml)	Sacarídeo/proteína (p/p)
α	518,00	82,30	0,16
β	11,00	7,94	0,72
γ	23,22	5,57	0,24
δ	22,87	5,08	0,22

TABELA 3b

S. aureus tipo 5 purificado foi conjugado a CRM197 usando outro método da invenção. Nesse método, as etapas de despolimerização, oxidação e conjugação foram realizadas como descrito acima, exceto que a etapa de conjugação foi realizada com a proteína de transporte derivatizada descrita acima (CRMadh) ao invés de CRM197. O teor de sacarídeo total no conjugado foi determinado por análise de HPAEC-PAD e o teor de proteína pelo ensaio MicroBCA (Tabela 4).

Conjugado (lote)	Proteína (µg/ml)	Sacarídeo (µg/ml)	Sacarídeo/proteína (p/p)
A'	58,25	2,49	0,043

TABELA 4

Métodos de despolimerização alternativos

Em outros estudos, diferentes condições foram testadas para despolimerização do polissacarídeo capsular purificado. O polissacarídeo foi dissolvido em água destilada a 2 mg/ml. Ácido acético foi adicionado até uma

concentração final de 2% ou 5% (v/v) e a reação mantida a 90°C por 30 minutos, 3 horas, 5 horas ou 6 horas. A solução foi então neutralizada e purificada em uma coluna de filtração em gel, como descrito acima. O sacarídeo foi detectado a 215 nm e reunido em pool (Figura 6).

As frações reunidas em pool foram então oxidadas e dialisadas contra água, como descrito acima. As frações foram conjugadas a CRM197 ou CRMadh, como descrito acima, e os conjugados resultantes purificados por cromatografia por filtração em gel, também como descrito acima (Figura 7).

Em outro estudo, ácido clorídrico a 0,5 M foi usado ao invés de ácido acético para polissacarídeo capsular do tipo 8, e a reação mantida a 90°C por 2,5 horas, com a reação tendo amostras retiradas a cada 30 minutos. As amostras forma analisadas por RNM e SEC-HPLC. O polissacarídeo não sofreu hidrólise e o nível de O-acetilação permaneceu quase inalterado. Em contraste, quando ácido clorídrico a 2 M foi usado, e a reação mantida a 100°C, foi observada hidrólise, mesmo após apenas 30 minutos. O nível de O-acetilação gradualmente caiu ao longo das 2,5 horas (Figuras 17 e 18 (com pico de acetil circulado)).

Estudo de imunização - modelo de abscesso (1)

Protocolo geral do ensaio: Camundongos foram imunizados de acordo com o esquema descrito abaixo e atacados por injeção intravenosa de uma suspensão bacteriana de *S. aureus*. A cultura de *S. aureus* foi centrifugada, lavada duas vezes e diluída em PBS antes do ataque. Foram necessárias diluições adicionais para o inóculo desejado, que foi verificado experimentalmente por plaqueamento em ágar e formação de colônia. Para coleta de

órgão, os camundongos foram sacrificados e seus rins removidos e homogeneizados em Triton X-100 1%. Alíquotas foram então diluídas e plaqueadas em meio de ágar para determinação em triplicata de CFU. Para histologia, o tecido do rim foi incubado em temperatura ambiente em formalina 10% por 24 horas. Os tecidos foram embebidos em parafina, cortados finos, corados por hematoxilina/eosina e examinados por microscopia.

Camundongos CD1 com 3 semanas de idade foram imunizados nos dias 0 e 11 por injeção intraperitoneal com uma dose de 5 µg de antígeno em um volume de injeção de 200 µl. Os camundongos foram sangrados nos dias 0 e 20 e atacados com *S. aureus* no dia 21. Os órgãos foram coletados no dia 25. As imunizações foram realizadas em grupos de oito camundongos de acordo com o seguinte esquema:

Grupo 1 - Alume isoladamente.

Grupo 2 - Polissacarídeo capsular do tipo 5 isoladamente.

Grupo 3 - Polissacarídeo capsular do tipo 5 mais alume.

Grupo 4 - Conjugado de polissacarídeo capsular do tipo 5-CRMadh (Lote 1).

Grupo 5 - Conjugado de polissacarídeo capsular do tipo 5-CRMadh (Lote 1) mais alume.

O conjugado induziu uma resposta de IgG específica contra polissacarídeo do tipo 5. A formulação de alume gerou uma resposta aumentada (Figura 8). O conjugado também induziu uma resposta de IgM específica contra polissacarídeo do tipo 5 (Figura 9). A formulação conjugada de alume também gerou a melhor proteção contra infecção

renal (Figura 10).

Estudo de imunização - modelo de abscesso (2)

Camundongos CD1 com 3 semanas de idade foram imunizados nos dias 1, 14 e 28 por injeção intraperitoneal com uma dose de 5 µg de antígeno em um volume de injeção de 200 µl. Os camundongos foram sangrados nos dias 0, 27 e 37 e atacados com *S. aureus* no dia 38. Os órgãos foram coletados no dia 42. As imunizações foram realizadas em grupos de oito camundongos de acordo com o seguinte esquema:

Grupo 1 - Alume isoladamente.

Grupo 2 - Polissacarídeo capsular do tipo 5 mais alume.

Grupo 3 - Conjugado de polissacarídeo capsular do tipo 5-CRMadh (Lote 2) mais alume.

Grupo 4 - Conjugado de polissacarídeo capsular do tipo 5-CRMadh (Lote A') mais alume.

Os conjugados induziram uma resposta de IgG específica contra polissacarídeo do tipo 5. Os conjugados da invenção (representados por lote A') geraram uma titulação particularmente elevada (Figura 11). Os conjugados da invenção geraram a melhor proteção contra infecção renal (Figura 12).

Estudo de imunização - modelo de abscesso (3)

Camundongos CD1 com 3 semanas de idade foram imunizados nos dias 1, 14 e 28 por injeção intraperitoneal com uma dose de 5 µg (ou dose de 0,5 µg, no caso do lote A) de antígeno em um volume de injeção de 200 µl. Os camundongos foram sangrados nos dias 0, 27 e 37 e atacados com *S. aureus* (desenvolvido em meio líquido ou sólido) no

dia 38. Os órgãos foram coletados no dia 42. As imunizações foram realizadas em grupos de oito camundongos de acordo com o seguinte esquema:

Grupo 1 - Alume isoladamente.

Grupo 2 - Polissacarídeo capsular do tipo 5 mais alume.

Grupo 3 - Conjugado de polissacarídeo capsular do tipo 5-CRMadh (Lote 2) mais alume.

Grupo 4 - Conjugado de polissacarídeo capsular do tipo 5-CRMadh (Lote 3) mais alume.

Grupo 5 - Conjugado de polissacarídeo capsular do tipo 5-CRMadh (Lote A') mais alume.

Grupo 6 - Conjugado de polissacarídeo capsular do tipo 5-CRM (Lote A) mais alume.

Grupo 7 - Conjugado de polissacarídeo capsular do tipo 5-CRM (Lote B) mais alume.

Os conjugados da invenção (representados pelos lotes A', A e B) geraram proteção contra infecção renal (Figuras 13A e 13B). Os conjugados da invenção geraram titulações elevadas de anticorpos IgG específicos com titulações baixas de anticorpos IgM (Figura 14).

Estudo de imunização - modelo de abscesso (4)

Camundongos CD1 com 3 semanas de idade foram imunizados nos dias 1 e 14 por injeção intraperitoneal com uma dose de 1 µg de antígeno em um volume de injeção de 200 µl. Os camundongos foram sangrados nos dias 0, 13 e 27 e atacados com *S. aureus* no dia 28. Os órgãos foram coletados no dia 32. As imunizações foram realizadas em grupos de oito ou nove camundongos de acordo com o seguinte esquema:

Grupo 1 - Conjugado de polissacarídeo capsular do tipo

8-CRM (lote α) mais alume.

Grupo 2 - Conjugado de polissacarídeo capsular do tipo 8-CRM (lote α) mais MF59.

Grupo 3 - Alume isoladamente.

Grupo 4 - MF59 isoladamente.

Os conjugados da invenção geraram proteção contra infecção renal (Figura 15). A formulação de alume gerou melhor proteção do que a formulação de MF59.

Estudo de imunização - modelo letal (1)

Protocolo geral do ensaio: Camundongos foram imunizados de acordo com o esquema descrito abaixo e atacados por injeção intraperitoneal de uma suspensão bacteriana de *S. aureus*. As culturas de *S. aureus* foram centrifugadas, lavadas duas vezes e diluídas em PBS antes do ataque. Foram necessárias diluições adicionais para o inóculo desejado, que foi verificado experimentalmente por plaqueamento em ágar e formação de colônia. Os animais foram monitorados por 14 dias e a doença letal registrada.

Camundongos CD1 foram imunizados por injeção intraperitoneal com uma dose de 5 µg de antígeno em um volume de injeção de 200 µl. As imunizações foram realizadas em grupos de doze camundongos de acordo com o seguinte esquema, antes do ataque com 5 x 10^8 CFU de *S. aureus* do tipo 5:

Grupo 1 - PBS mais alume.

Grupo 2 - Conjugado de polissacarídeo capsular do tipo 5-CRM (Lote C) mais alume.

Grupo 3 - Conjugado de polissacarídeo capsular do tipo 5-CRMadh (Lote 3) mais alume.

Os conjugados da invenção (representados por lote C)

geraram sobrevida mais elevada (Figura 16).

Estudo de imunização - modelo letal (2)

Camundongos CD1 foram imunizados por injeção intraperitoneal com uma dose de 2 µg (sacarídeo) e de 10 µ (proteína, quando presente) de antígeno em um volume de injeção de 200 µl. As imunizações foram realizadas em grupos de doze camundongos de acordo com o seguinte esquema, antes do ataque com 5 x 10^8 CFU *S. aureus* do tipo 5:

Grupo 1 - PBS mais alume.

Grupo 2 - Conjugado de polissacarídeo capsular do tipo 5-CRM (Lote D) mais alume.

Grupo 3 - Conjugado de polissacarídeo capsular do tipo 5-CRMadh (Lote 4) mais alume.

Grupo 4 - Conjugado de polissacarídeo capsular do tipo 5-CRM (Lote D) mais proteínas EsxAB, Sta006 e Sta011 e alume.

Grupo 5 - Conjugado de polissacarídeo capsular do tipo 5-CRM (Lote D) mais proteínas HlaH35L, Sta006 e Sta011 e alume.

Os dados de sobrevida são apresentados na Tabela 5.

Grupo	Tempo (dias)													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	100	25	17	17	17	17	17	17	17	17	8	0	0	0
2	100	50	50	50	50	50	50	50	50	42	42	42	42	42
3	100	50	42	42	42	42	42	42	42	33	33	33	33	33
4	100	67	67	67	67	67	67	67	67	67	67	67	67	67
5	100	100	100	100	100	100	83	83	75	75	75	75	75	75

TABELA 5

Os conjugados da invenção (representados por lote D) geraram sobrevida mais elevada. A sobrevida foi aumentada por adição de antígenos protéicos de *S. aureus*.

Estudo de imunização - modelo letal (3)

Camundongos CD1 foram imunizados por injeção intraperitoneal com doses de 2 µg (polissacarídeo do tipo 5), 1 µg (polissacarídeo do tipo 8, quando presente) e 10 µ (proteína, quando presente) de antígeno em um volume de injeção de 200 µl. As imunizações foram realizadas em grupos de doze camundongos de acordo com o seguinte esquema, antes do ataque com 5 x 10^8 CFU tipo 5 *S. aureus*:

Grupo 1 - PBS mais alume.

Grupo 2 - Conjugado de polissacarídeo capsular do tipo 5-CRM (lote E) mais proteínas EsxAB, Sta006 e Sta011 e alume.

Grupo 3 - Conjugado de polissacarídeo capsular do tipo 5-CRM (lote E) e conjugado de polissacarídeo capsular do tipo 8-CRM (lote β) mais proteínas EsxAB, Sta006 e Sta011 e alume.

Grupo 4 - Conjugado de polissacarídeo capsular do tipo 5-CRM (lote E) e conjugado de polissacarídeo capsular do tipo 8-CRM (lote β) mais proteínas EsxAB, Sta011 e Sta073 e alume.

Os dados de sobrevida são apresentados na Tabela 7.

Grupo	Tempo (dias)													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	100	50	42	42	42	42	42	42	42	42	33	33	33	33
2	100	42	42	42	42	42	42	42	42	42	33	33	33	33
3	100	75	75	75	75	75	75	75	75	75	58	50	50	50
4	100	92	92	83	83	83	83	83	83	83	75	75	75	75

TABELA 7

Estudo de imunização - modelo letal (4)

Camundongos CD1 foram imunizados por injeção intraperitoneal com doses de 2 µg (polissacarídeo capsular do tipo 5), 1 µg (polissacarídeo capsular do tipo 8, quando presente) e 10 µ (proteína, quando presente) de antígeno em um volume de injeção de 200 µl. As imunizações foram realizadas em grupos de doze camundongos de acordo com o seguinte esquema, antes do ataque com 5 x 10^8 CFU tipo 5 *S. aureus*:

Grupo 1 - PBS mais alume.

Grupo 2 - Conjugado de polissacarídeo capsular do tipo 5-CRM (lote E) e conjugado de polissacarídeo capsular do tipo 8-CRM (primeira dose do lote γ, segunda dose do lote δ) mais proteínas EsxAB, Sta006 e Sta011 e alume.

Grupo 3 - Conjugado de polissacarídeo capsular do tipo 5-CRM (lote E) e conjugado de polissacarídeo capsular do tipo 8-CRM (primeira dose do lote γ, segunda dose do lote δ) mais alume.

Grupo 4 - Conjugado de polissacarídeo capsular do tipo 5-CRM (lote E) e conjugado de polissacarídeo capsular do tipo 8-CRM (primeira dose do lote γ, segunda dose do lote δ) mais proteína EsxAB e alume.

Grupo 5 - Conjugado de polissacarídeo capsular do tipo 5-CRM (lote E) e conjugado de polissacarídeo capsular do tipo 8-CRM (primeira dose do lote γ, segunda dose do lote δ) mais proteína Sta006 e alume.

Grupo 6 - Conjugado de polissacarídeo capsular do tipo 5-CRM (lote E) e conjugado de polissacarídeo capsular do tipo 8-CRM (primeira dose do lote γ, segunda dose do lote

δ) mais proteína Sta011 e alume.

Grupo 7 - Conjugado de polissacarídeo capsular do tipo 5-CRM (lote E) e conjugado de polissacarídeo capsular do tipo 8-CRM (primeira dose do lote γ, segunda dose do lote δ) mais proteínas Sta006 e Sta011 e alume.

Grupo 8 - Conjugado de polissacarídeo capsular do tipo 5-CRM (lote E) mais proteínas HlaH35L, Sta006 e Sta011 e alume.

Grupo 9 - Conjugado de polissacarídeo capsular do tipo 5-CRM (lote E) mais proteína HlaH35L e alume.

Os dados de sobrevida são apresentados na Tabela 8.

Grupo	Tempo (dias)													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	100	100	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
2	100	88	75	75	63	63	63	50	50	50	50	50	50	50
3	100	100	63	63	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38
4	100	100	75	75	75	75	75	75	63	50	50	25	25	25
5	100	100	50	50	50	50	50	38	38	38	38	38	38	38
6	100	100	25	25	25	25	25	25	25	25	25	13	13	13
7	100	88	63	63	63	63	63	50	50	50	50	50	50	50
8	100	100	100	100	88	88	88	88	88	75	75	75	75	75
9	100	88	88	63	38	38	38	38	38	13	13	13	13	13

TABELA 8

Será subentendido que a invenção foi descrita apenas como exemplo e que podem ser feitas modificações que permanecem ainda dentro do escopo e espírito da invenção.

REFERÊNCIAS

[1] Fattom e *cols.* (1990) *Infect. Immun.* 58(7): 2.367-74.

[2] Fattom e *cols.* (1992) *Infect. Immun.* 60(2): 584-9.

[3] Fattom *e cols.* (1993) *Infect. Immun.* 61(3): 1.023-32.

[4] Fattom *e cols.* (1996) *Infect. Immun.* 64(5): 1.659-65.

[5] Welch *e cols.* (1996) *J. Am. Soc. Nephrol.* 7(2): 247-53.

[6] Fattom *e cols.* (1998) *Infect. Immun.* 66(10): 4.588-92.

[7] Fattom *e cols.* (1993) *Vaccine* 17(2): 126-33.

[8] Fattom *e cols.* (2002) *N. Engl. J. Med.* 346(7): 491-6.

[9] Robbins *e cols.* (2005) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 754: 68-82.

[10] Reynaud-Rondier *e cols.* (1991) *FEMS Microbiology Immunology* 76: 193-200.

[11] Tollersrud *e cols.* (2001) *Vaccine.* 19 (28-29): 3.896-903.

[12] WO 03/061558.

[13] Gilbert *e cols.* (1994) *Vaccine.* 12(4): 369-74.

[14] Moreau *e cols.* (1990) *Carbohydrate Res.* 339(5): 285-91.

[15] Fournier *e cols.* (1984) *Infect. Immun.* 45(1): 87-93.

[16] Jones (2005) *Carbohydrate Res.* 340(6): 1;097-106.

[17] Lemercinier e Jones (1996) *Carbohydrate Res.* 296: 83-96.

[18] Jones and Lemercinier (2002) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30(4): 1.233-47.

[19] WO 05/033148.

[20] WO 00/56357.

[21] Hestrin (1949) *J. Biol. Chem.* 180: 249-261.

[22] Konadu e *cols.* (1994) *Infect. Immun.* 62: 5.048-5.054.

[23] Gilbert e *cols.* (1994) *J. Microb. Meth.* 20: 39-46.

[24] Pedido de Patente U.S. 61/256.905 "PURIFICATION OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS TYPE 5 AND TYPE 8 CAPSULAR SACCHARIDES" (NOVARTIS AG). Referência N° 53615 US-PSP.

[25] Ramsay e *cols.* (2001) *Lancet* 357(9251): 195-196.

[26] Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Supl. 2: S28-36.

[27] Buttery e Moxon (2000) *J. R. Coll. Physicians Lond.* 34: 163-168.

[28] Ahmad e Chapnick (1999) *Infect. Dis. Clin. North Am.* 13: 113-33, vii.

[29] Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47: 563-567.

[30] Patente Européia 0477508.

[31] Patente U.S. 5.306.492.

[32] WO 98/42721.

[33] Dick e *cols.* Em "Conjugate Vaccines" (eds. Cruse e *cols.*) Karger, Basel, 1989, 10: 48-114.

[34] Hermanson "Bioconjugate Techniques", Academic Press, San Diego (1996) ISBN: 0123423368.

[35] Revelação de Pesquisa, 453077 (Jan 2002).

[36] Herbelin e *cols.* (1997) *J. Dairy Sci.* 80(9): 2.025-34.

[37] EP-A-0372501.

[38] EP-A-0378881.

[39] EP-A 0427347.

[40] WO 93/17712.

[41] WO 94/03208.

[42] WO 98/58668.

[43] EP A 0471177.

[44] WO 91/01146.

[45] Falugi *e cols.* (2001) *Eur. J. Immunol.* 31: 3.816-3.824.

[46] Baraldo *e cols.* (2004) *Infect. Immun.* 72(8): 4.884-7.

[47] EP-A-0594610.

[48] Ruan *e cols.* (1990) *J. Immunol.* 145: 3.379-3.384.

[49] WO 00/56360.

[50] WO 02/091998.

[51] Kuo *e cols.* (1995) *Infect. Immun.* 63: 2.706-13.

[52] Michon *e cols.* (1998) *Vaccine.* 16: 1.732-41.

[53] WO 01/72337.

[54] WO 00/61761.

[55] WO 2004/041157.

[56] WO 02/34771.

[57] WO 99/42130.

[58] WO 2004/011027.

[59] WO 2007/113222.

[60] Patente U.S. 6.045.805.

[61] Patentes U.S. 6.027.733 e 6.274.144.

[62] www.polimer.de

[63] Patentes U.S. 4.356.170 e 4.663.160.

[64] Patente U.S. 4711779.

[65] WO 00/10599.

[66] Patente U.S. 4.057.685.

[67] WO 96/40242.

[68] Lei *e cols.* (2000) *Dev. Biol.* (Basel) 103: 259-264.

[69] WO 00/38711; Patente U.S. 6.146.902.

[70] WO 2004/080490.

[71] WO 2006/032475.

[72] WO 2006/032500.

[73] WO 2006/065553.

[74] WO 2007/118979.

[75] WO 99/24578.

[76] WO 99/36544.

[77] WO 99/57280.

[78] WO 00/22430.

[79] Tettelin e *cols.* (2000) *Science* 287: 1.809-1.815.

[80] WO 96/29412.

[81] Pizza e *cols.* (2000) *Science* 287: 1.816-1.820.

[82] WO 01/52885.

[83] Bjune *e cols.* (1991) *Lancet* 338(8775): 1.093-1.096.

[84] Fukasawa e *cols.* (1999) *Vaccine* 17: 2.951-2.958.

[85] Rosenqvist *e cols.* (1998) *Dev. Biol. Stand.* 92: 323-333.

[86] Costantino *e cols.* (1992) *Vaccine* 10: 691-698.

[87] WO 03/007985.

[88] Watson (2000) *Pediatr. Infect. Dis. J.* 19: 331-332.

[89] Rubin (2000) *Pediatr. Clin. North Am.* 47: 269-285, v.

[90] Jedrzejas (2001) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65: 187-207.

[91] Bell (2000) *Pediatr. Infect. Dis. J.* 19: 1.187-1.188.

[92] Iwarson (1995) *APMIS* 103: 321-326.

[93] Gerlich *e cols.* (1990) *Vaccine* 8 Supl.: S63-68 e 79-80.

[94] Hsu *e cols.* (1999) *Clin. Liver Dis.* 3: 901-915.

[95] Gustafsson *e cols.* (1996) *N. Engl. J. Med.* 334: 349-355.

[96] Rappuoli *e cols.* (1991) *TIBTECH* 9: 232-238.

[97] "Vaccines" (2004) eds. Plotkin e Orenstein. ISBN 0-7216-9688-0.

[98] WO 02/02606.

[99] Kalman *e cols.* (1999) *Nature Genetics* 21: 385-389.

[100] Read *e cols.* (2000) *Nucleic Acids Res.* 28: 1397-406.

[101] Shirai *e cols.* (2000) *J. Infect. Dis.* 181(Supl. 3): S524-S527.

[102] WO 99/27105.

[103] WO 00/27994.

[104] WO 00/37494.

[105] WO 99/28475.

[106] Ross *e cols.* (2001) *Vaccine* 19: 4.135-4.142.

[107] Sutter *e cols.* (2000) *Pediatr. Clin. North Am.* 47: 287-308.

[108] Zimmerman e Spann (1999) *Am. Fam. Physician* 59: 113-118, 125-126.

[109] Dreesen (1997) *Vaccine* 15 Suppl:S2-6.

[110] *MMWR Morb. Mortal Wkly. Rep.* 1998 Jan 16; 47(1): 12, 19.

[111] McMichael (2000) *Vaccine* 19 Supl. 1: S101-107.

[112] WO 02/34771.

[113] Dale (1999) *Infect. Dis. Clin. North Am.* 13:

227-43, viii.

[114] Ferretti *e cols.* (2001) *PNAS USA* 98: 4.658-4.663.

[115] WO 03/093306.

[116] WO 2004/018646.

[117] WO 2004/041157.

[118] lchiman e Yoshida (1981) *J. Appl. Bacteriol.* 51: 229.

[119] US4197290.

[120] lchiman *e cols.* (1991) *J. Appl. Bacteriol.* 71: 176.

[121] Robinson e Torres (1997) *Seminars in Immunology* 9: 271-283.

[122] Donnelly *e cols.* (1997) *Annu. Rev. Immunol.* 15: 617-648.

[123] Scott-Taylor e Dalgleish (2000) *Expert. Opin. Investig. Drugs* 9: 471-480.

[124] Apostolopoulos e Plebanski (2000) *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2: 441-447.

[125] Ilan (1999) *Curr. Opin. Mol. Ther.* 1: 116-120.

[126] Dubensky *e cols.* (2000) *Mol. Med.* 6: 723-732.

[127] Robinson e Pertmer (2000) *Adv. Virus Res.* 55: 1-74.

[128] Donnelly *e cols.* (2000) *Am. J. Respir. Crit. Care* Med 162 (4 Parte 2): S190-193.

[129] Davis (1999) *Mt. Sinai J. Med.* 66: 84-90.

[130] Paoletti *e cols.* (2001) *Vaccine* 19: 2.118-2.126.

[131] WO 00/56365.

[132] Gennaro (2000) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy". 20ª Edição, ISBN: 0683306472.

[133] WO 03/009869.

[134] Almeida e Alpar (1996) *J. Drug Targeting* 3: 455-467.

[135] Agarwal e Mishra (1999) *Indian J. Exp. Biol.* 37: 6-16.

[136] WO 00/53221.

[137] Jakobsen *e cols.* (2002) *Infect. Immun.* 70: 1.443-1.452.

[138] Bergquist *e cols.* (1998) *APMIS* 106: 800-806.

[139] Baudner *e cols.* (2002) *Infect. Immun.* 70: 4.785-4.790.

[140] Ugozzoli *e cols.* (2002) *J. Infect. Dis.* 186: 1.358-1.361.

[141] "*Vaccine* Design..." (1995) eds. Powell e Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.

[142] WO 00/23105.

[143] WO 90/14837.

[144] Podda (2001) *Vaccine* 19: 2.673-80.

[145] Frey *e cols.* (2003) *Vaccine* 21: 4.234-7.

[146] Patente U.S. 6.299.884.

[147] Patente U.S. 6.451.325.

[148] Patente U.S. 5.057.540.

[149] WO 96/33739.

[150] EP A 0109942.

[151] WO 96/11711.

[152] WO 00/07621.

[153] Barr *e cols.* (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32: 247-271.

[154] Sjolanderet *e cols.* (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32: 321 338.

[155] Niikura *e cols.* (2002) *Virology* 293: 273-280.

[156] Lenz *e cols.* (2001) *J. Immunol.* 166: 5.346-5.355.

[157] Pinto *e cols.* (2003) *J. Infect. Dis.* 188: 327-338.

[158] Gerber *e cols.* (2001) *Virol.* 75: 4.752-4.760.

[159] WO 03/024480.

[160] WO 03/024481.

[161] Gluck *e cols.* (2002) *Vaccine* 20: B10-B16.

[162] EP A 0689454.

[163] Johnson *e cols.* (1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9: 2.273-2.278.

[164] Evans *e cols.* (2003) *Expert Rev. Vaccines* 2: 219-229.

[165] Meraldi *e cols.* (2003) *Vaccine* 21: 2.485-2.491.

[166] Pajak *e cols.* (2003) *Vaccine* 21: 836-842.

[167] Kandimalla *e cols.* (2003) *Nucleic Acids Research* 31: 2.393-2.400.

[168] WO 02/26757.

[169] WO 99/62923.

[170] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9: 831-835.

[171] McCluskie *e cols.* (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32: 179-185.

[172] WO 98/40100.

[173] Patente U.S. 6.207.646.

[174] Patente U.S. 6.239.116.

[175] Patente U.S. 6.429.199.

[176] Kandimalla *e cols.* (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (parte 3): 654-658.

[177] Blackwell *e cols.* (2003) *J. Immunol.* 170: 4.061-

4.068.

[178] Krieg (2002) *Trends Immunol.* 23: 64-65.

[179] WO 01/95935.

[180] Kandimalla *e cols.* (2003) *BBRC* 306: 948-953.

[181] Bhagat *e cols.* (2003) *BBRC* 300: 853-861.

[182] WO 03/035836.

[183] WO 95/17211.

[184] WO 98/42375.

[185] Beignon *e cols.* (2002) *Infect. Immun.* 70: 3.012-3.019.

[186] Pizza *e cols.* (2001) *Vaccine* 19: 2.534-2.541.

[187] Pizza *e cols.* (2000) *Int. J. Med. Microbiol.* 290: 455-461.

[188] Scharton-Kersten *e cols.* (2000) *Infect. Immun.* 68: 5.306-5.313.

[189] Ryan *e cols.* (1999) *Infect. Immun.* 67: 6.270-6.280.

[190] Partidos *e cols.* (1999) *Immunol. Lett.* 67: 209-216.

[191] Peppoloni *e cols.* (2003) *Expert Rev. Vaccines* 2: 285-293.

[192] Pine *e cols.* (2002) *J. Control Release* 85: 263-270.

[193] Domenighini *e cols.* (1995) *Mol. Microbiol.* 15: 1.165-1.167.

[194] WO 99/40936.

[195] WO 99/44636.

[196] Singh *e cols.* (2001) *J. Cont. Release* 70: 267-276.

[197] WO 99/27960.

[198] Patente U.S. 6.090.406.

[199] Patente U.S. 5.916.588.

[200] EP A 0626169.

[201] WO 99/52549.

[202] WO 01/21207.

[203] WO 01/21152.

[204] Andrianov *e cols.* (1998) *Biomaterials* 19: 109-115.

[205] Payne *e cols.* (1998) *Adv. Drug Delivery Review* 31: 185-196.

[206] Stanley (2002) *Clin. Exp. Dermatol.* 27: 571-577.

[207] Jones (2003) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 4: 214-218.

[208] WO 04/60308.

[209] WO 04/64759.

[210] WO 99/11241.

[211] WO 94/00153.

[212] WO 98/57659.

[213] Pedidos de Patente Européia 0835318, 0735898 e 0761231.

[214] Joyce *e cols.* (2003) *Carbohydrate Research* 338: 903.

[215] Maira-Litran *e cols.* (2002) *Infect. Immun.* 70: 4.433.

[216] WO 2004/043407.

[217] WO 2007/113224.

[218] WO 2004/043405.

[219] WO 98/10788.

[220] WO 2007/053176.

[221] WO 2007/113222.

[222] WO 2005/009379.

[223] WO 2009/029132.

[224] WO 2008/079315.

[225] WO 2005/086663.

[226] WO 2005/115113.

[227] WO 2006/033918.

[228] WO 2006/078680.

[229] Kuroda *e cols.* (2001) Lancet 357 (9264): 1.225-1.240; veja também páginas 1.218-1.219.

[230] Sjodahl (1977) *J. Biochem.* 73: 343-351.

[231] Uhlen *e cols.* (1984) *J. Biol. Chem.* 259: 1.695-1.702 e 13.628 (Corr.).

[232] Schneewind *e cols.* (1992) *Cell* 70: 267-281.

[233] DeDent *e cols.* (2008) *EMBO J.* 27: 2.656-2.668.

[234] Sjoquist *e cols.* (1972) *Eur. J. Biochem.* 30: 190-194.

[235] DeDent *e cols.* (2007) *J. Bacteriol.* 189: 4.473-4.484.

[236] Deisenhofer *e cols.*, (1978) *Hoppe-Seyh Zeitsch. Physiol. Chem.* 359: 975-985.

[237] Deisenhofer (1981) *Biochemistry* 20: 2.361-2.370.

[238] Graille *e cols.* (2000) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 97: 5.399-5.404.

[239] O'Seaghdha *e cols.* (2006) *FEBS J.* 273: 4.831-41.

[240] Gomez *e cols.* (2006) *J. Biol. Chem.* 281: 20.190-20.196.

[241] WO 2007/071692.

[242] Sebulsky e Heinrichs (2001) *J. Bacteriol.* 183: 4.994-5.000.

[243] Sebulsky *e cols.* (2003) *J. Biol. Chem.* 278:

49.890-900.

[244] WO 2005/009378.

[245] Rable e Wardenburg (2009) *Infect. Immun.* 77: 2.712-8.

[246] WO 2007/145689.

[247] WO 2009/029831.

[248] WO 2005/079315.

[249] WO 2008/152447.

[250] Kuklin *e cols.* (2006) *Infect. Immun.* 74(4): 2.215-23.

[251] WO 2005/009379.

[252] Gennaro (2000) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy". 20ª Edição, ISBN: 0683306472.

[253] "Methods In Enzymology" (S. Colowick e N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.).

[254] "Handbook of Experimental Immunology", Vols. I IV (D.M. Weir e C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications).

[255] Sambrook *e cols.* (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3ª Edição (Cold Spring Harbor Laboratory Press).

[256] "Handbook of Surface and Colloidal Chemistry" (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997).

[257] Ausubel *e cols.* (eds) (2002) "Short protocols in molecular biology", 5ª Edição ("Current Protocols").

[258] "Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course", (Ream *e cols.*, eds., 1998, Academic Press).

[259] "PCR (Introduction to Biotechniques Series)", 2ª Edição (Newton e Graham eds., 1997, Springer Verlag).

[260] "Current Protocols in Molecular Biology" (F.M. Ausubel *e cols.*, eds., 1987) Suplemento 30.

[261] Smith e Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489.

[262] Geysen *e cols.* (1984) *PNAS USA* 81: 3.998-4.002.

[263] Carter (1994) *Methods Mol. Biol.* 36: 207-23.

[264] Jameson, B.A. *e cols.* 1988, *CABIOS* 4(1): 181-186.

[265] Raddrizzani e Hammer (2000) *Brief Bioinform.* 1(2): 179-89.

[266] Bublil *e cols.* (2007) *Proteins* 68(1): 294-304.

[267] De Lalla *e cols.* (1999) *J. Immunol.* 163: 1.725-29.

[268] Kwok *e cols.* (2001) *Trends Immunol.* 22: 583-88.

[269] Brusic *e cols.* (1998) *Bioinformatics* 14(2): 121-30.

[270] Meister *e cols.* (1995) *Vaccine* 13(6): 581-91.

[271] Roberts *e cols.* (1996) *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 12(7): 593-610.

[272] Maksyutov e Zagrebelnaya (1993) *Comput. Appl. Biosci.* 9(3): 291-7.

[273] Feller e de la Cruz (1991) *Nature* 349(6311): 720-1.

[274] Hopp (1993) *Peptide Research* 6: 183-190.

[275] Welling *e cols.* (1985) *FEBS Lett.* 188: 215-218.

[276] Davenport *e cols.* (1995) *Immunogenetics* 42: 392-297.

[277] Tsurui e Takahashi (2007) *J. Pharmacol. Sci.* 105(4): 299-316.

[278] Tong *e cols.* (2007) *Brief Bioinform.* 8(2): 96-

108.

[279] Schirle *e cols.* (2001) *J. Immunol. Methods.* 257(1-2): 1-16.

[280] Chen *e cols.* (2007) *Amino Acids* 33(3): 423-8.

[281] Bardotti *e cols.* (2008) *Vaccine.* 26(18): 2.284-96.

LISTAGEM DE SEQÜENCIAS

ID. DE SEQ. N°: 1

MNMKKKEKHAIRKKSIGVASVLVGTLIGFGLLSSKEADASENSVTQSDSASNESKSNDS
SSVSAAPKTDDTNVSDTKTSSNTNNGETSVAQNPAQQETTQSSSTNATTEETPVTGEAT
TTTTNQANTPATTQSSNTNAEELVNQTSNETTSNDTNTVSSVNSPQNSTNAENVSTTQD
TSTEATPSNNESAPQSTDASNKDVVNQAVNTSAPRMRAFSLAAVAADAPVAGTDITNQL
TNVTVGIDSGTTVYPHQAGYVKLNYGFSVPNSAVKGDTFKITVPKELNLNGVTSTAKVP
PIMAGDQVLANGVIDSDGNVIYTFTDYVNTKDDVKATLTMPAYIDPENVKKTGNVTLAT
GIGSTTANKTVLVDYEKYGKFYNLSIKGTIDQIDKTNNTYRQTIYVNPSGDNVIAPVLT
GNLKPNTDSNALIDQQNTSIKVYKVDNAADLSESYFVNPENFEDVTNSVNITFPNPNQY
KVEFNTPDDQITTPYIVVVNGHIDPNSKGDLALRSTLYGYNSNIIWRSMSWDNEVAFNN
GSGSGDGIDKPVVPEQPDEPGEIEPIPEDSDSDPGSDSGSDSNSDSGSDSGSDSTSDSG
SDSASDSDSASDSDSASDSDSASDSDSASDSDSDNDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDS
DSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSD
SDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDS
ASDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSESDSDSDSDSDSDSDSD
SDSDSASDSDSGSDSDSSSDSDSESDSNSDSESVSNNNVVPPNSPKNGTNASNKNEAKD
SKEPLPDTGSEDEANTSLIWGLLASIGSLLLFRRKKENKDKK

ID. DE SEQ. N°: 2

SENSVTQSDSASNESKSNDSSSVSAAPKTDDTNVSDTKTSSNTNNGETSVAQNPAQQET
TQSSSTNATTEETPVTGEATTTTTNQANTPATTQSSNTNAEELVNQTSNETTSNDTNTV
SSVNSPQNSTNAENVSTTQDTSTEATPSNNESAPQSTDASNKDVVNQAVNTSAPRMRAF
SLAAVAADAPVAGTDITNQLTNVTVGIDSGTTVYPHQAGYVKLNYGFSVPNSAVKGDTF
KITVPKELNLNGVTSTAKVPPIMAGDQVLANGVIDSDGNVIYTFTDYVNTKDDVKATLT

MPAYIDPENVKKTGNVTLATGIGSTTANKTVLVDYEKYGKFYNLSIKGTIDQIDKTNNT
YRQTIYVNPSGDNVIAPVLTGNLKPNTDSNALIDQQNTSIKVYKVDNAADLSESYFVNP
ENFEDVTNSVNITFPNPNQYKVEFNTPDDQITTPYIVVVNGHIDPNSKGDLALRSTLYG
YNSNIIWRSMSWDNEVAFNNGSGSGDGIDKPVVPEQPDEPGEIEPIPE

ID. DE SEQ. N°: 3

MKKRIDYLSNKQNKYSIRRFTVGTTSVIVGATILFGIGNHQAQASEQSNDTTQSSKNNA
SADSEKNNMIETPQLNTTANDTSDISANTNSANVDSTTKPMSTQTSNTTTTEPASTNET
PQPTAIKNQATAAKMQDQTVPQEANSQVDNKTTNDANSIATNSELKNSQTLDLPQSSPQ
TISNAQGTSKPSVRTRAVRSLAVAEPVVNAADAKGTNVNDKVTASNFKLEKTTFDPNQS
GNTFMAANFTVTDKVKSGDYFTAKLPDSLTGNGDVDYSNSNNTMPIADIKSTNGDVVAK
ATYDILTKTYTFVFTDYVNNKENINGQFSLPLFTDRAKAPKSGTYDANINIADEMFNNK
ITYNYSSPIAGIDKPNGANISSQIIGVDTASGQNTYKQTVFVNPKQRVLGNTWVYIKGY
QDKIEESSGKVSATDTKLRIFEVNDTSKLSDSYYADPNDSNLKEVTDQFKNRIYYEHPN
VASIKFGDITKTYVVLVEGHYDNTGKNLKTQVIQENVDPVTNRDYSIFGWNNENVVRYG
GGSADGDSAVNPKDPTPGPPVDPEPSPDPEPEPTPDPEPSPDPEPEPSPDPDPDSDSDS
DSGSDSDSGSDSDSESDSDSDSDSDSDSDSDSESDSDSESDSESDSDSDSDSDSDSDSD
SDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDS
DSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSD
SDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSRVTPPNNEQKAPSNPKGEVNHS
NKVSKQHKTDALPETGDKSENTNATLFGAMMALLGSLLLFRKRKQDHKEKA

ID. DE SEQ. N°: 4

SEQSNDTTQSSKNNASADSEKNNMIETPQLNTTANDTSDISANTNSANVDSTTKPMSTQ
TSNTTTTEPASTNETPQPTAIKNQATAAKMQDQTVPQEANSQVDNKTTNDANSIATNSE
LKNSQTLDLPQSSPQTISNAQGTSKPSVRTRAVRSLAVAEPVVNAADAKGTNVNDKVTA
SNFKLEKTTFDPNQSGNTFMAANFTVTDKVKSGDYFTAKLPDSLTGNGDVDYSNSNNTM
PIADIKSTNGDVVAKATYDILTKTYTFVFTDYVNNKENINGQFSLPLFTDRAKAPKSGT
YDANINIADEMFNNKITYNYSSPIAGIDKPNGANISSQIIGVDTASGQNTYKQTVFVNP
KQRVLGNTWVYIKGYQDKIEESSGKVSATDTKLRIFEVNDTSKLSDSYYADPNDSNLKE
VTDQFKNRIYYEHPNVASIKFGDITKTYVVLVEGHYDNTGKNLKTQVIQENVDPVTNRD
YSIFGWNNENVVRYGGGSADGDSAVNPKDPTPGPPV

ID. DE SEQ. N°: 5

SEQSNDTTQSSKNNASADSEKNNMIETPQLNTTANDTSDISANTNSANVDSTTKPMSTQ
TSNTTTTEPASTNETPQPTAIKNQATAAKMQDQTVPQEANSQVDNKTTNDANSIATNSE
LKNSQTLDLPQSSPQTISNAQGTSKPSVRTRAVRSLAVAEPVVNAADAKGTNVNDKVTA
SNFKLEKTTFDPNQSGNTFMAANFTVTDKVKSGDYFTAKLPDSLTGNGDVDYSNSNNTM
PIADIKSTNGDVVAKATYDILTKTYTFVFTDYVNNKENINGQFSLPLFTDRAKAPKSGT
YDANINIADEMFNNKITYNYS

ID. DE SEQ. N°: 6

GTNVNDKVTASNFKLEKTTFDPNQSGNTFMAANFTVTDKVKSGDYFTAKLPDSLTGNGD
VDYSNSNNTMPIADIKSTNGDVVAKATYDILTKTYTFVFTDYVNNKENINGQFSLPLFT
DRAKAPKSGTYDANINIADEMFNNKITYNYSSPIAGIDKPNGANISSQIIGVDTASGQN
TYKQTVFVNPKQRVLGNTWVYIKGYQDKIEESSGKVSATDTKLRIFEVNDTSKLSDSYY
ADPNDSNLKEVTDQFKNRIYYEHPNVASIKFGDITKTYVVLVEGHYDNTGKNLKTQVIQ
ENVDPVTNRDYSIFGWNNENVVRYGGGSADGDSAVN

ID. DE SEQ. N°: 7

SSPIAGIDKPNGANISSQIIGVDTASGQNTYKQTVFVNPKQRVLGNTWVYIKGYQDKIE
ESSGKVSATDTKLRIFEVNDTSKLSDSYYADPNDSNLKEVTDQFKNRIYYEHPNVASIK
FGDITKTYVVLVEGHYDNTGKNLKTQVIQENVDPVTNRDYSIFGWNNENVVRYGGGSAD
GDSAVN

ID. DE SEQ. N°: 8

MINRDNKKAITKKGMISNRLNKFSIRKYTVGTASILVGTTLIFGLGNQEAKAAENTSTE
NAKQDDATTSDNKEVVSETENNSTTENNSTNPIKKETNTDSQPEAKKESTSSSTQKQQN
NVTATTETKPQNIEKENVKPSTDKTATEDTSVILEEKKAPNNTNNDVTTKPSTSEPSTS
EIQTKPTTPQESTNIENSQPQPTPSKVDNQVTDATNPKEPVNVSKEELKNNPEKLKELV
RNDSNTDHSTKPVATAPTSVAPKRVNAKMRFAVAQPAAVASNNVNDLIKVTKQTIKVGD
GKDNVAAAHDGKDIEYDTEFTIDNKVKKGDTMTINYDKNVIPSDLTDKNDPIDITDPSG
EVIAKGTFDKATKQITYTFTDYVDKYEDIKSRLTLYSYIDKKTVPNETSLNLTFATAGK
ETSQNVTVDYQDPMVHGDSNIQSIFTKLDEDKQTIEQQIYVNPLKKSATNTKVDIAGSQ
VDDYGNIKLGNGSTIIDQNTEIKVYKVNSDQQLPQSNRIYDFSQYEDVTSQFDNKKSFS
NNVATLDFGDINSAYIIKVVSKYTPTSDGELDIAQGTSMRTTDKYGYYNYAGYSNFIVT

SNDTGGGDGTVKPEEKLYKIGDYVWEDVDKDGVQGTDSKEKPMANVLVTLTYPDGTTKS
VRTDANGHYEFGGLKDGETYTVKFETPTGYLPTKVNGTTDGEKDSNGSSVTVKINGKDD
MSLDTGFYKEPKYNLGDYVWEDTNKDGIQDANEPGIKDVKVTLKDSTGKVIGTTTTDAS
GKYKFTDLDNGNYTVEFETPAGYTPTVKNTTADDKDSNGLTTTGVIKDADNMTLDRGFY
KTPKYSLGDYVWYDSNKDGKQDSTEKGIKDVTVTLQNEKGEVIGTTKTDENGKYRFDNL
DSGKYKVIFEKPAGLTQTVTNTTEDDKDADGGEVDVTITDHDDFTLDNGYFEEDTSDSD
SDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDS
DSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSD
SDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDAGKHTPVKPMSTTKD
HHNKAKALPETGSENNGSNNATLFGGLFAALGSLLLFGRRKKQNK

ID. DE SEQ. N°: 9

AENTSTENAKQDDATTSDNKEVVSETENNSTTENNSTNPIKKETNTDSQPEAKKESTSS
STQKQQNNVTATTETKPQNIEKENVKPSTDKTATEDTSVILEEKKAPNNTNNDVTTKPS
TSEPSTSEIQTKPTTPQESTNIENSQPQPTPSKVDNQVTDATNPKEPVNVSKEELKNNP
EKLKELVRNDSNTDHSTKPVATAPTSVAPKRVNAKMRFAVAQPAAVASNNVNDLIKVTK
QTIKVGDGKDNVAAAHDGKDIEYDTEFTIDNKVKKGDTMTINYDKNVIPSDLTDKNDPI
DITDPSGEVIAKGTFDKATKQITYTFTDYVDKYEDIKSRLTLYSYIDKKTVPNETSLNL
TFATAGKETSQNVTVDYQDPMVHGDSNIQSIFTKLDEDKQTIEQQIYVNPLKKSATNTK
VDIAGSQVDDYGNIKLGNGSTIIDQNTEIKVYKVNSDQQLPQSNRIYDFSQYEDVTSQF
DNKKSFSNNVATLDFGDINSAYIIKVVSKYTPTSDGELDIAQGTSMRTTDKYGYYNYAG
YSNFIVTSNDTGGGDGTVKPEEKLYKIGDYVWEDVDKDGVQGTDSKEKP

ID. DE SEQ. N°: 10

MNNKKTATNRKGMIPNRLNKFSIRKYSVGTASILVGTTLIFGLSGHEAKAAEHTNGELN
QSKNETTAPSENKTTKKVDSRQLKDNTQTATADQPKVTMSDSATVKETSSNMQSPQNAT
ANQSTTKTSNVTTNDKSSTTYSNETDKSNLTQAKDVSTTPKTTTIKPRTLNRMAVNTVA
APQQGTNVNDKVHFSNIDIAIDKGHVNQTTGKTEFWATSSDVLKLKANYTIDDSVKEGD
TFTFKYGQYFRPGSVRLPSQTQNLYNAQGNIIAKGIYDSTTNTTTYTFTNYVDQYTNVR
GSFEQVAFAKRKNATTDKTAYKMEVTLGNDTYSEEIIVDYGNKKAQPLISSTNYINNED
LSRNMTAYVNQPKNTYTKQTFVTNLTGYKFNPNAKNFKIYEVTDQNQFVDSFTPDTSKL
KDVTDQFDVIYSNDNKTATVDLMKGQTSSNKQYIIQQVAYPDNSSTDNGKIDYTLDTDK

TKYSWSNSYSNVNGSSTANGDQKKYNLGDYVWEDTNKDGKQDANEKGIKGVYVILKDSN
GKELDRTTTDENGKYQFTGLSNGTYSVEFSTPAGYTPTTANVGTDDAVDSDGLTTTGVI
KDADNMTLDSGFYKTPKYSLGDYVWYDSNKDGKQDSTEKGIKGVKVTLQNEKGEVIGTT
ETDENGKYRFDNLDSGKYKVIFEKPAGLTQTGTNTTEDDKDADGGEVDVTITDHDDFTL
DNGYYEEETSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSD
SDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDS
DSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDNDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSD
SDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDNDSDSDSDSDSDAGKHTPAKP
MSTVKDQHKTAKALPETGSENNNSNNGTLFGGLFAALGSLLLFGRRKKQNK

ID. DE SEQ. N°: 11

AEHTNGELNQSKNETTAPSENKTTKKVDSRQLKDNTQTATADQPKVTMSDSATVKETSS
NMQSPQNATANQSTTKTSNVTTNDKSSTTYSNETDKSNLTQAKDVSTTPKTTTIKPRTL
NRMAVNTVAAPQQGTNVNDKVHFSNIDIAIDKGHVNQTTGKTEFWATSSDVLKLKANYT
IDDSVKEGDTFTFKYGQYFRPGSVRLPSQTQNLYNAQGNIIAKGIYDSTTNTTTYTFTN
YVDQYTNVRGSFEQVAFAKRKNATTDKTAYKMEVTLGNDTYSEEIIVDYGNKKAQPLIS
STNYINNEDLSRNMTAYVNQPKNTYTKQTFVTNLTGYKFNPNAKNFKIYEVTDQNQFVD
SFTPDTSKLKDVTDQFDVIYSNDNKTATVDLMKGQTSSNKQYIIQQVAYPDNSSTDNGK
IDYTLDTDKTKYSWSNSYSNVNGSSTANGDQKKYNLGDYVWEDTNKDGKQDANEK

ID. DE SEQ. N°: 12

MAKYRGKPFQLYVKLSCSTMMATSIILTNILPYDAQAASEKDTEITKEILSKQDLLDKV
DKAIRQIEQLKQLSASSKEHYKAQLNEAKTASQIDEIIKRANELDSKDNKSSHTEMNGQ
SDIDSKLDQLLKDLNEVSSNVDRGQQSGEDDLNAMKNDMSQTATTKHGEKDDKNDEAMV
NKALEDLDHLNQQIHKSKDASKDTSEDPAVSTTDNNHEVAKTPNNDGSGHVVLNKFLSN
EENQSHSNRLTDKLQGSDKINHAMIEKLAKSNASTQHYTYHKLNTLQSLDQRIANTQLP
KNQKSDLMSEVNKTKERIKSQRNIILEELARTDDKKYATQSILESIFNKDEAVKILKDI
RVDGKTDQQIADQITRHIDQLSLTTSDDLLTSLIDQSQDKSLLISQILQTKLGKAEADK
LAKDWTNKGLSNRQIVDQLKKHFASTGDTSSDDILKAILNNAKDKKQAIETILATRIER
QKAKLLADLITKIETDQNKIFNLVKSALNGKADDLLNLQKRLNQTKKDIDYILSPIVNR
PSLLDRLNKNGKTTDLNKLANLMNQGSDLLDSIPDIPTPKPEKTLTLGKGNGLLSGLLN
ADGNVSLPKAGETIKEHWLPISVIVGAMGVLMIWLSRRNKLKNKA

ID. DE SEQ. N°: 13

MKKKLLVLTMSTLFATQIMNSNHAKASVTESVDKKFVVPESGINKIIPAYDEFKNSPKV
NVSNLTDNKNFVASEDKLNKIADSSAASKIVDKNFVVPESKLGNIVPEYKEINNRVNVA
TNNPASQQVDKHFVAKGPEVNRFITQNKVNHHFITTQTHYKKVITSYKSTHVHKHVNHA
KDSINKHFIVKPSESPRYTHPSQSLIIKHHFAVPGYHAHKFVTPGHASIKINHFCVVPQ
INSFKVIPPYGHNSHRMHVPSFQNNTTATHQNAKVNKAYDYKYFYSYKVVKGVKKYFSF
SQSNGYKIGKPSLNIKNVNYQYAVPSYSPTHYVPEFKGSLPAPRV

ID. DE SEQ. N°: 14

KFVVPESGINKIIPAYDEFKNSPKVNVSNLTDNKNFVASEDKLNKIADSSAASKIVDKN
FVVPESKLGNIVPEYKEINNRVNVATNNPASQQVDKHFVAKGPEVNRFITQNKVNHHFI
TTQTHYKKVITSYKSTHVHKHVNHAKDSINKHFIVKPSESPRYTHPSQSLIIKHHFAVP
GYHAHKFVTPGHASIKINHFCVVPQINSFKVIPPYGHNSHRMHVPSFQNNTTATHQNAK
VNKAYDYKYFYSYKVVKGVKKYFSFSQSNGYKIGKPSLNIKNVNYQYAVPSYSPTHYVP
EFKGSLPAPRV

ID. DE SEQ. N°: 15

SVTESVDKKFVVPESGINKIIPAYDEFKNSPKVNVSNLTDNKNFVASEDKLNKIADSSA
ASKIVDKNFVVPESKLGNIVPEYKEINNRVNVATNNPASQQVDKHFVAKGPEVNRFITQ
NKVNHHFITTQTHYKKVITSYKSTHVHKHVNHAKDSINKHFIVKPSESPRYTHPSQSLI
IKHHFAVPGYHAHKFVTPGHASIKINHFCVVPQINSFKVIPPYGHNSHRMHVPSFQNNT
TATHQNAKVNKAYDYKYFYSYKVVKGVKKYFSFSQSNGYKIGKPSLNIKNVNYQYAVPS
YSPTHYVPEFKGS

ID. DE SEQ. N°: 16

KFVVPESGINKIIPAYDEFKNSPKVNVSNLTDNKNFVASEDKLNKIADSSAASKIVDKN
FVVPESKLGNIVPEYKEINNRVNVATNNPASQQVDKHFVAKGPEVNRFITQNKVNHHFI
TTQTHYKKVITSYKSTHVHKHVNHAKDSINKHFIVKPSESPRYTHPSQSLIIKHHFAVP
GYHAHKFVTPGHASIKINHFCVVPQINSFKVIPPYGHNSHRMHVPSFQNNTTATHQNAK
VNKAYDYKYFYSYKVVKGVKKYFSFSQSNGYKIGKPSLNIKNVNYQYAVPSYSPTHYVP
EFKGS

ID. DE SEQ. N°: 17

SVTESVDKKFVVPESGINKIIPAYDEFKNSPKVNVSNLTDNKNFVASEDKLNKIADSSA

ASKIVDKNFVVPESKLGNIVPEYKEINNRVNVATNNPASQQVDKHFVAKGPEVNRFITQ
NKV

ID. DE SEQ. N°: 18

MLNRENKTAITRKGMVSNRLNKFSIRKYTVGTASILVGTTLIFGLGNQEAKAAESTNKE
LNEATTSASDNQSSDKVDMQQLNQEDNTKNDNQKEMVSSQGNETTSNGNKLIEKESVQS
TTGNKVEVSTAKSDEQASPKSTNEDLNTKQTISNQEALQPDLQENKSVVNVQPTNEENK
KVDAKTESTTLNVKSDAIKSNDETLVDNNSNSNNENNADIILPKSTAPKRLNTRMRIAA
VQPSSTEAKNVNDLITSNTTLTVVDADKNNKIVPAQDYLSLKSQITVDDKVKSGDYFTI
KYSDTVQVYGLNPEDIKNIGDIKDPNNGETIATAKHDTANNLITYTFTDYVDRFNSVQM
GINYSIYMDADTIPVSKNDVEFNVTIGNTTTKTTANIQYPDYVVNEKNSIGSAFTETVS
HVGNKENPGYYKQTIYVNPSENSLTNAKLKVQAYHSSYPNNIGQINKDVTDIKIYQVPK
GYTLNKGYDVNTKELTDVTNQYLQKITYGDNNSAVIDFGNADSAYVVMVNTKFQYTNSE
SPTLVQMATLSSTGNKSVSTGNALGFTNNQSGGAGQEVYKIGNYVWEDTNKNGVQELGE
KGVGNVTVTVFDNNTNTKVGEAVTKEDGSYLIPNLPNGDYRVEFSNLPKGYEVTPSKQG
NNEELDSNGLSSVITVNGKDNLSADLGIYKPKYNLGDYVWEDTNKNGIQDQDEKGISGV
TVTLKDENGNVLKTVTTDADGKYKFTDLDNGNYKVEFTTPEGYTPTTVTSGSDIEKDSN
GLTTTGVINGADNMTLDSGFYKTPKYNLGNYVWEDTNKDGKQDSTEKGISGVTVTLKNE
NGEVLQTTKTDKDGKYQFTGLENGTYKVEFETPSGYTPTQVGSGTDEGIDSNGTSTTGV
IKDKDNDTIDSGFYKPTYNLGDYVWEDTNKNGVQDKDEKGISGVTVTLKDENDKVLKTV
TTDENGKYQFTDLNNGTYKVEFETPSGYTPTSVTSGNDTEKDSNGLTTTGVIKDADNMT
LDSGFYKTPKYSLGDYVWYDSNKDGKQDSTEKGIKDVKVTLLNEKGEVIGTTKTDENGK
YCFDNLDSGKYKVIFEKPAGLTQTVTNTTEDDKDADGGEVDVTITDHDDFTLDNGYFEE
DTSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDS
DSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSD
SDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDAGKHTPVKP
MSTTKDHHNKAKALPETGSENNGSNNATLFGGLFAALGSLLLFGRRKKQNK

ID. DE SEQ. N°: 19

AESTNKELNEATTSASDNQSSDKVDMQQLNQEDNTKNDNQKEMVSSQGNETTSNGNKLI
EKESVQSTTGNKVEVSTAKSDEQASPKSTNEDLNTKQTISNQEALQPDLQENKSVVNVQ
PTNEENKKVDAKTESTTLNVKSDAIKSNDETLVDNNSNSNNENNADIILPKSTAPKRLN

TRMRIAAVQPSSTEAKNVNDLITSNTTLTVVDADKNNKIVPAQDYLSLKSQITVDDKVK
SGDYFTIKYSDTVQVYGLNPEDIKNIGDIKDPNNGETIATAKHDTANNLITYTFTDYVD
RFNSVQMGINYSIYMDADTIPVSKNDVEFNVTIGNTTTKTTANIQYPDYVVNEKNSIGS
AFTETVSHVGNKENPGYYKQTIYVNPSENSLTNAKLKVQAYHSSYPNNIGQINKDVTDI
KIYQVPKGYTLNKGYDVNTKELTDVTNQYLQKITYGDNNSAVIDFGNADSAYVVMVNTK
FQYTNSESPTLVQMATLSSTGNKSVSTGNALGFTNNQSGGAGQEVYKIGNYVWEDTNKN
GVQELGEKG

ID. DE SEQ. N°: 20

PDYVVNEKNSIGSAFTETVSHVGNKENPGYYKQTIYVNPSENSLTNAKLKVQAYHSSYP
NNIGQINKDVTDIKIYQVPKGYTLNKGYDVNTKELTDVTNQYLQKITYGDNNSAVIDFG
NADSAYVVMVNTKFQYTNSESPTLVQMATLSSTGNKSVSTGNALGFTNNQSGGAGQEVY
KIGNYVWEDTNKNGVQELGEKG

ID. DE SEQ. N°: 21

MKKKNIYSIRKLGVGIASVTLGTLLISGGVTPAANAAQHDEAQQNAFYQVLNMPNLNAD
QRNGFIQSLKDDPSQSANVLGEAQKLNDSQAPKADAQQNNFNKDQQSAFYEILNMPNLN
EAQRNGFIQSLKDDPSQSTNVLGEAKKLNESQAPKADNNFNKEQQNAFYEILNMPNLNE
EQRNGFIQSLKDDPSQSANLLSEAKKLNESQAPKADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEE
QRNGFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPKADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLTEEQ
RNGFIQSLKDDPSVSKEILAEAKKLNDAQAPKEEDNNKPGKEDNNKPGKEDNNKPGKED
NNKPGKEDNNKPGKEDGNKPGKEDNKKPGKEDGNKPGKEDNKKPGKEDGNKPGKEDGNK
PGKEDGNGVHVVKPGDTVNDIAKANGTTADKIAADNKLADKNMIKPGQELVVDKKQPAN
HADANKAQALPETGEENPFIGTTVFGGLSLALGAALLAGRRREL

ID. DE SEQ. N°: 22

AQHDEAQQNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKDDPSQSANVLGEAQKLNDSQAPKADA
QQNNFNKDQQSAFYEILNMPNLNEAQRNGFIQSLKDDPSQSTNVLGEAKKLNESQAPKA
DNNFNKEQQNAFYEILNMPNLNEEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLSEAKKLNESQAPKAD
NKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPKADN
KFNKEQQNAFYEILHLPNLTEEQRNGFIQSLKDDPSVSKEILAEAKKLNDAQA

ID. DE SEQ. N°: 23

MNFNDIETMVKSKFKDIKKHAEEIAHEIEVRSGYLRKAEQYKRLEFNLSFALDDIESTA

KDVQTAKSSANKDSVTVKGKAPNTLYIEKRNLMKQKLEMLGEDIDKNKESLQKAKEIAG
EKASEYFNKAMN

ID. DE SEQ. N°: 24

MAMIKMSPEEIRAKSQSYGQGSDQIRQILSDLTRAQGEIAANWEGQAFSRFEEQFQQLS
PKVEKFAQLLEEIKQQLNSTADAVQEQDQQLSNNFGLQ

ID. DE SEQ. N°: 25

MGGYKGIKADGGKVDQAKQLAAKTAKDIEACQKQTQQLAEYIEGSDWEGQFANKVKDVL
LIMAKFQEELVQPMADHQKAIDNLSQNLAKYDTLSIKQGLDRVNP

ID. DE SEQ. N°: 26

MKKLLLPLIIMLLVLAACGNQGEKNNKAETKSYKMDDGKTVDIPKDPKRIAVVAPTYAG
GLKKLGANIVAVNQQVDQSKVLKDKFKGVTKIGDGDVEKVAKEKPDLIIVYSTDKDIKK
YQKVAPTVVVDYNKHKYLEQQEMLGKIVGKEDKVKAWKKDWEETTAKDGKEIKKAIGQD
ATVSLFDEFDKKLYTYGDNWGRGGEVLYQAFGLKMQPEQQKLTAKAGWAEVKQEEIEKY
AGDYIVSTSEGKPTPGYESTNMWKNLKATKEGHIVKVDAGTYWYNDPYTLDFMRKDLKE
KLIKAAK

ID. DE SEQ. N°: 27

MKNILKVFNTTILALIIIIATFSNSANAADSGTLNYEVYKYNTNDTSIANDYFNKPAKY
IKKNGKLYVQITVNHSHWITGMSIEGHKENIISKNTAKDERTSEFEVSKLNGKIDGKID
VYIDEKVNGKPFKYDHHYNITYKFNGPTDVAGANAPGKDDKNSASGSDKGSDGTTTGQS
ESNSSNKDKVENPQTNAGTPAYIYAIPVASLALLIAITLFVRKKSKGNVE

ID. DE SEQ. N°: 28

MKTRIVSSVTTTLLLGSILMNPVANAADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENG
MHKKVFYSFIDDKNHNKKLLVIRTKGTIAGQYRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPD
NEVAQISDYYPRNSIDTKEYMSTLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIGHTLKYVQP
DFKTILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNWGPYDRDSWNPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNF
LDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTN
TKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTN

ID. DE SEQ. N°: 29

ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMLKKVFYSFIDDKNHNKKLLVIRTKG
TIAGQYRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPRNSIDTKEYMSTLTY

GFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQ
NWGPYDRDSWNPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDR
KASKQQTNIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTN

ID. DE SEQ. N°: 30

PSGS

ID. DE SEQ. N°: 31

ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMLKKVFYSFIDDKNHNKKLLVIRTKG
TIAGQYRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPRNSIDTPSGSVQPDF
KTILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNWGPYDRDSWNPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNFLD
PNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTK
DKWIDRSSERYKIDWEKEEMTN

ID. DE SEQ. N°: 32

ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKKLLVIRTKG
TIAGQYRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPRNSIDTPSGSVQPDF
KTILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNWGPYDRDSWNPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNFLD
PNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTK
DKWIDRSSERYKIDWEKEEMTN

ID. DE SEQ. N°: 33

ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNK

ID. DE SEQ. N°: 34

ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKKLLVIRTKG
TIAG

ID. DE SEQ. N°: 35

ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKKLL

ID. DE SEQ. N°: 36

ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMLKKVFYSFIDDKNHNK

ID. DE SEQ. N°: 37

ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMLKKVFYSFIDDKNHNKKLLVIRTKG
TIAG

ID. DE SEQ. N°: 38

ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMLKKVFYSFIDDKNHNKKLL

ID. DE SEQ. N°: 39

MMKRLNKLVLGIIFLFLVISITAGCGIGKEAEVKKSFEKTLSMYPIKNLEDLYDKEGYR
DDQFDKNDKGTWIINSEMVIQPNNEDMVAKGMVLYMNRNTKTTNGYYYVDVTKDEDEGK
PHDNEKRYPVKMVDNKIIPTKEIKDEKIKKEIENFKFFVQYGDFKNLKNYKDGDISYNP
EVPSYSAKYQLTNDDYNVKQLRKRYDIPTSKAPKLLLKGSGNLKGSSVGYKDIEFTFVE
KKEENIYFSDSLDYKKSGDV

ID. DE SEQ. N°: 40

MMKRLNKLVLGIIFLFLVISITAGCGIGKEAEVKKSFEKTLSMYPIKNLEDLYDKEGYR
DDQFDKNDKGTWIINSEMVIQPNNEDMVAKGMVLYMNRNTKTTNGYYYVDVTKDEDEGK
PHDNEKRYPVKMVDNKIIPTKEIKDEKLKKEIENFKFFVQYGDFKNIKNYKDGDISYNP
EVPSYSAKYQLTNDDYNVKQLRKRYDIPTSKAPKLLLKGSGNLKGSSVGYKDIEFTFVE
KKEENIYFSDSLDYKKSGDV

ID. DE SEQ. N°: 41

MMKRLNKLVLGIIFLFLVISITAGCGIGKEAEVKKSFEKTLSMYPIKNLEDLYDKEGYR
DDQFDKNDKGTWIINSEMVIQPNNEDMVAKGMVLYMNRNTKTTNGYYYVDVTKDEDEGK
PHDNEKRYPVKMVDNKIIPTKEIKDEKVKKEIENFKFFVQYGDFKNIKNYKDGDISYNP
EVPSYSAKYQLTNDDYNVKQLRKRYDIPTSKAPKLLLKGSGNLKGSSVGYKDIEFTFVE
KKEENIYFSDSLDYKKSGDV

ID. DE SEQ. N°: 42

MMKRLNKLVLGIIFLFLVISITAGCGIGKEAEVKKSFEKTLSMYPIKNLEDLYDKEGYR
DDQFDKNDKGTWIINSEMVIQPNNEDMVAKGMVLYMNRNTKTTNGYYYVDVTKDEDEGK
PHDNEKRYPVKMVDNKIIPTKEIKDEKLKKEIENFKFFVQYGDFKNVKNYKDGDISYNP
EVPSYSAKYQLTNDDYNVKQLRKRYDIPTSKAPKLLLKGSGNLKGSSVGYKDIEFTFVE
KKEENIYFSDSLDYKKSGDV

ID. DE SEQ. N°: 43

MTKHYLNSKYQSEQRSSAMKKITMGTASIILGSLVYIGADSQQVNAATEATNATNNQST
QVSQATSQPINFQVQKDGSSEKSHMDDYMQHPGKVIKQNNKYYFQTVLNNASFWKEYKF
YNANNQELATTVVNDNKKADTRTINVAVEPGYKSLTTKVHIVVPQINYNHRYTTHLEFE
KAIPTLADAAKPNNVKPVQPKPAQPKTPTEQTKPVQPKVEKVKPTVTTTSKVEDNHSTK

VVSTDTTKDQTKTQTAHTVKTAQTAQEQNKVQTPVKDVATAKSESNNQAVSDNKSQQTN

KVTKHNETPKQASKAKELPKTGLTSVDNFISTVAFATLALLGSLSLLLFKRKESK

ID. DE SEQ. N°: 44

DSQQVNAATEATNATNNQSTQVSQATSQPINFQVQKDGSSEKSHMDDYMQHPGKVIKQN

NKYYFQTVLNNASFWKEYKFYNANNQELATTVVNDNKKADTRTINVAVEPGYKSLTTKV

HIVVPQINYNHRYTTHLEFEKAIPTLA

ID. DE SEQ. N°: 45

MNKQQKEFKSFYSIRKSSLGVASVAISTLLLLMSNGEAQAAAEETGGTNTEAQPKTEAV

ASPTTTSEKAPETKPVANAVSVSNKEVEAPTSETKEAKEVKEVKAPKETKEVKPAAKAT

NNTYPILNQELREAIKNPAIKDKDHSAPNSRPIDFEMKKKDGTQQFYHYASSVKPARVI

FTDSKPEIELGLQSGQFWRKFEVYEGDKKLPIKLVSYDTVKDYAYIRFSVSNGTKAVKI

VSSTHFNNKEEKYDYTLMEFAQPIYNSADKFKTEEDYKAEKLLAPYKKAKTLERQVYEL

NKIQDKLPEKLKAEYKKKLEDTKKALDEQVKSAITEFQNVQPTNEKMTDLQDTKYVVYE

SVENNESMMDTFVKHPIKTGMLNGKKYMVMETTNDDYWKDFMVEGQRVRTISKDAKNNT

RTIIFPYVEGKTLYDAIVKVHVKTIDYDGQYHVRIVDKEAFTKANTDKSNKKEQQDNSA

KKEATPATPSKPTPSPVEKESQKQDSQKDDNKQLPSVEKENDASSESGKDKTPATKPTK

GEVESSSTTPTKVVSTTQNVAKPTTASSKTTKDVVQTSAGSSEAKDSAPLQKANIKNTN

DGHTQSQNNKNTQENKAKSLPQTGEESNKDMTLPLMALLALSSIVAFVLPRKRKN

ID. DE SEQ. N°: 46

MAKKFNYKLPSMVALTLVGSAVTAHQVQAAETTQDQTTNKNVLDSNKVKATTEQAKAEV

KNPTQNISGTQVYQDPAIVQPKTANNKTGNAQVSQKVDTAQVNGDTRANQSATTNNTQP

VAKSTSTTAPKTNTNVTNAGYSLVDDEDDNSENQINPELIKSAAKPAALETQYKTAAPK

AATTSAPKAKTEATPKVTTFSASAQPRSVAATPKTSLPKYKPQVNSSINDYICKNNLKA

PKIEEDYTSYFPKYAYRNGVGRPEGIVVHDTANDRSTINGEISYMKNNYQNAFVHAFVD

GDRIIETAPTDYLSWGVGAVGNPRFINVEIVHTHDYASFARSMNNYADYAATQLQYYGL

KPDSAEYDGNGTVWTHYAVSKYLGGTDHADPHGYLRSHNYSYDQLYDLINEKYLIKMGK

VAPWGTQSTTTPTTPSKPTTPSKPSTGKLTVAANNGVAQIKPTNSGLYTTVYDKTGKAT

NEVQKTFAVSKTATLGNQKFYLVQDYNSGNKFGWVKEGDVVYNTAKSPVNVNQSYSIKP

GTKLYTVPWGTSKQVAGSVSGSGNQTFKASKQQQIDKSIYLYGSVNGKSGWVSKAYLVD

TAKPTPTPTPKPSTPTTNNKLTVSSLNGVAQINAKNNGLFTTVYDKTGKPTKEVQKTFA

VTKEASLGGNKFYLVKDYNSPTLIGWVKQGDVIYNNAKSPVNVMQTYTVKPGTKLYSVP
WGTYKQEAGAVSGTGNQTFKATKQQQIDKSIYLFGTVNGKSGWVSKAYLAVPAAPKKAV
AQPKTAVKAYTVTKPQTTQTVSKIAQVKPNNTGIRASVYEKTAKNGAKYADRTFYVTKE
RAHGNETYVLLNNTSHNIPLGWFNVKDLNVQNLGKEVKTTQKYTVNKSNNGLSMVPWGT
KNQVILTGNNIAQGTFNATKQVSVGKDVYLYGTINNRTGWVNAKDLTAPTAVKPTTSAA
KDYNYTYVIKNGNGYYYVTPNSDTAKYSLKAFNEQPFAVVKEQVINGQTWYYGKLSNGK
LAWIKSTDLAKELIKYNQTGMTLNQVAQIQAGLQYKPQVQRVPGKWTDAKFNDVKHAMD
TKRLAQDPALKYQFLRLDQPQNISIDKINQFLKGKGVLENQGAAFNKAAQMYGINEVYL
ISHALLETGNGTSQLAKGADVVNNKVVTNSNTKYHNVFGIAAYDNDPLREGIKYAKQAG
WDTVSKAIVGGAKFIGNSYVKAGQNTLYKMRWNPAHPGTHQYATDVDWANINAKIIKGY
YDKIGEVGKYFDIPQYK

ID. DE SEQ. N°: 47

GSGGGG

ID. DE SEQ. N°: 48

GSGSGGGG

ID. DE SEQ. N°: 49

ASGGGS

ID. DE SEQ. N°: 50

GCTAGCGGTGGCGGATCC

ID. DE SEQ. N°: 51

HHHHHH

ID. DE SEQ. N°: 52

MAMIKMSPEEIRAKSQSYGQGSDQIRQILSDLTRAQGEIAANWEGQAFSRFEEQFQQLS
PKVEKFAQLLEEIKQQLNSTADAVQEQDQQLSNNFGLQASGGGSMGGYKGIKADGGKVD
QAKQLAAKTAKDIEACQKQTQQLAEYIEGSDWEGQFANKVKDVLLIMAKFQEELVQPMA
DHQKAIDNLSQNLAKYDTLSIKQGLDRVNP

ID. DE SEQ. N°: 53

ATGGCAATGATTAAGATGAGTCCAGAGGAAATCAGAGCAAAATCGCAATCTTACGGGCA
AGGTTCAGACCAAATCCGTCAAATTTTATCTGATTTAACACGTGCACAAGGTGAAATTG
CAGCGAACTGGGAAGGTCAAGCTTTCAGCCGTTTCGAAGAGCAATTCCAACAACTTAGT

CCTAAAGTAGAAAAATTTGCACAATTATTAGAAGAAATTAAACAACAATTGAATAGCAC

TGCTGATGCCGTTCAAGAACAAGACCAACAACTTTCTAATAATTTCGGTTTGCAAGCTA

GCGGTGGCGGATCCGGTGGATATAAAGGTATTAAAGCAGATGGTGGCAAGGTTGATCAA

GCGAAACAATTAGCGGCAAAAACAGCTAAAGATATTGAAGCATGTCAAAAGCAAACGCA

ACAGCTCGCTGAGTATATCGAAGGTAGTGATTGGGAAGGACAGTTCGCCAATAAGGTGA

AAGATGTGTTACTCATTATGGCAAAGTTTCAAGAAGAATTAGTACAACCGATGGCTGAC

CATCAAAAAGCAATTGATAACTTAAGTCAAAATCTAGCGAAATACGATACATTATCAAT

TAAGCAAGGGCTTGATAGGGTGAACCCA

ID. DE SEQ. N°: 54

MGGYKGIKADGGKVDQAKQLAAKTAKDIEACQKQTQQLAEYIEGSDWEGQFANKVKDVL

LIMAKFQEELVQPMADHQKAIDNLSQNLAKYDTLSIKQGLDRVNPASGGGSMAMIKMSP

EEIRAKSQSYGQGSDQIRQILSDLTRAQGEIAANWEGQAFSRFEEQFQQLSPKVEKFAQ

LLEEIKQQLNSTADAVQEQDQQLSNNFGLQ

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a preparação de um conjugado de um polissacarídeo capsular de *S. aureus* tipo 5 ou tipo 8 e uma molécula de transporte, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de: (a) despolimerização do polissacarídeo capsular, para gerar um fragmento de polissacarídeo; (b) oxidação do fragmento a fim de introduzir um grupo aldeído em pelo menos um resíduo sacarídico no fragmento, para gerar um resíduo sacarídico oxidado; e (c) acoplamento do resíduo sacarídico oxidado a uma molécula de transporte por meio do grupo aldeído, gerando, dessa forma, o conjugado.

2. Processo para o tratamento de um polissacarídeo capsular de S. aureus do tipo 5, caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de despolimerização do polissacarídeo capsular, para gerar um fragmento de polissacarídeo que possui uma porção β-D-FucNAc-(1→ em seu terminal não redutor.

3. Processo para o tratamento de um polissacarídeo capsular de *S. aureus* do tipo 8, caracterizado pelo fato de compreende a etapa de despolimerização do polissacarídeo capsular, para gerar um fragmento de polissacarídeo que possui uma porção α-D-FucNAc-(1→ em seu terminal não redutor.

4. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2 ou 3, caracterizado pelo fato de que a despolimerização é realizada por hidrólise ácida usando ácido acético.

5. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3 ou 4, caracterizado pelo fato de que

a massa molecular média do fragmento está entre 5 e 100 kDa.

6. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4 ou 5, caracterizado pelo fato de que o grau de O-acetilação do fragmento é de 10-90%.

7. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 e 4, 5 ou 6, caracterizado pelo fato de que etapa (a) é a etapa definida na reivindicação 2 ou reivindicação 3.

8. Processo para o fornecimento de um polissacarídeo capsular de *S. aureus* do tipo 5 derivado, caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de oxidação de um polissacarídeo capsular de *S. aureus* do tipo 5 que possui uma porção β-D-FucNAc-(1→ em seu terminal não redutor para converter dois grupos hidroxil vizinhos na porção β-D-FucNAc-(1→ em dois grupos aldeído.

9. Processo para o fornecimento de um polissacarídeo capsular de *S. aureus* do tipo 8 derivado, caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de oxidação de um polissacarídeo capsular de *S. aureus* do tipo 8 que possui uma porção α-D-FucNAc-(1→ em seu terminal não redutor para converter dois grupos hidroxil vizinhos na porção α-D-FucNAc-(1→ em dois grupos aldeído.

10. Processo, da reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a etapa (b) é a etapa definida na reivindicação 8 ou reivindicação 9.

11. Processo para o fornecimento de um polissacarídeo capsular de *S. aureus* do tipo 5 acoplado, caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de acoplamento a uma molécula de transporte de um polissacarídeo capsular de *S.*

aureus do tipo 5 que possui uma porção β-D-FucNAc-1→ em seu terminal não redutor que foi oxidada para converter dois grupos hidroxil vizinhos em dois grupos aldeído, em que o acoplamento é por meio de um dos grupos aldeído.

12. Processo para o fornecimento de um polissacarídeo capsular de *S. aureus* do tipo 8 acoplado, caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de acoplamento a uma molécula de transporte de um polissacarídeo capsular de *S. aureus* do tipo 8 que possui uma porção α D-FucNAc-(1→ em seu terminal não redutor que foi oxidada para converter dois grupos hidroxil vizinhos em dois grupos aldeído, em que o acoplamento é por meio de um dos grupos aldeído.

13. Processo, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o processo é usado para a preparação de um conjugado de um polissacarídeo capsular de *S. aureus* do tipo 5 e uma molécula de transporte, que compreende as etapas de: (a) despolimerização do polissacarídeo capsular, para gerar um fragmento de polissacarídeo que possui a porção β-D-FucNAc-(1→ em seu terminal não redutor; (b) oxidação do fragmento a fim de converter dois grupos hidroxil vizinhos na porção β-D-FucNAc-(1→ em dois grupos aldeído; e (c) acoplamento do fragmento oxidado a uma molécula de transporte por meio de um dos grupos aldeído, gerando, dessa forma, o conjugado.

14. Processo, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o processo é usado para a preparação de um conjugado de um polissacarídeo capsular de *S. aureus* do tipo 8 e uma molécula de transporte, que compreende as etapas de: (a) despolimerização do polissacarídeo capsular, para gerar um fragmento de

polissacarídeo que possui a porção α-D-FucNAc-(1→ em seu terminal não redutor; (b) oxidação do fragmento a fim de converter dois grupos hidroxil vizinhos na porção α-D-FucNAc-(1→ em dois grupos aldeído; e (c) acoplamento do fragmento oxidado a uma molécula de transporte por meio de um dos grupos aldeído, gerando, dessa forma, o conjugado.

15. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 e 4, 5, 6 ou 7 e 10, 11, 12, 13 ou 14, caracterizado pelo fato de que o acoplamento é acoplamento direto por reação do grupo aldeído com um grupo amina no veículo por aminação redutiva.

16. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 e 4, 5, 6, ou 7 e 10, 11, 12, 13 ou 14, caracterizado pelo fato de que o acoplamento é por meio de um vinculador por reação do grupo aldeído com um grupo amina no vinculador por aminação redutiva.

17. Processo, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o vinculador é anexado à molécula de transporte.

18. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 e 4, 5, 6 ou 7 e 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ou 17, caracterizado pelo fato de que o acoplamento resulta em uma proporção de polissacarídeo:proteína (p/p) entre 1:5 e 1:2.

19. Polissacarídeo conjugado, fragmento, derivado ou acoplado, caracterizado por ser obtido ou passível de obtenção pelo processo de qualquer uma das reivindicações precedentes.

20. Composição imunogênica caracterizada pelo fato de que compreende um polissacarídeo conjugado ou acoplado de

acordo com a reivindicação 19.

21. Composição, de acordo com a reivindicação 20, caracterizada ainda por compreender um ou mais antígenos protéicos de *S. aureus* selecionados do grupo que consiste em um antígeno clfA; um antígeno clfB; um antígeno sdrE2; um antígeno sdrC; um antígeno sasF; um antígeno emp; um antígeno sdrD; um antígeno spa; um antígeno esaC; um antígeno esxA; um antígeno esxB; um antígeno sta006; um antígeno isdC; um antígeno Hla; um antígeno sta011; um antígeno isdA; um antígeno isdB; e um antígeno sta073.

22. Composição, de acordo com a reivindicação 21, caracterizada pelo fato de que os (ou mais) antígenos protéicos de *S. aureus* são selecionados do grupo que consiste em um antígeno esxA; um antígeno esxB; um antígeno sta006; um antígeno Hla; um antígeno sta011; e um antígeno sta073.

23. Composição, de acordo com a reivindicação 22, caracterizada pelo fato de que a composição compreende antígenos protéicos de *S. aureus* de acordo com uma das combinações (1) a (10) abaixo:

(1) um antígeno esxA, um antígeno esxB, um antígeno sta006 e um antígeno Hla;

(2) um antígeno esxA, um antígeno esxB, um antígeno sta006 e um antígeno sta011;

(3) um antígeno esxA, um antígeno esxB e um antígeno sta011;

(4) um antígeno esxA, um antígeno esxB, um antígeno Hla, um antígeno sta006 e um antígeno sta011;

(5) um antígeno esxA, um antígeno esxB e um antígeno Hla;

(6) um antígeno Hla, um antígeno sta006 e um antígeno sta011;

(7) um antígeno esxA e um antígeno esxB;

(8) um antígeno esxA, um antígeno esxB e um antígeno sta006;

(9) um antígeno esxA, um antígeno esxB, um antígeno sta011 e um antígeno sta073; e

(10) um antígeno sta006 e um antígeno sta011.

FIGURA 1

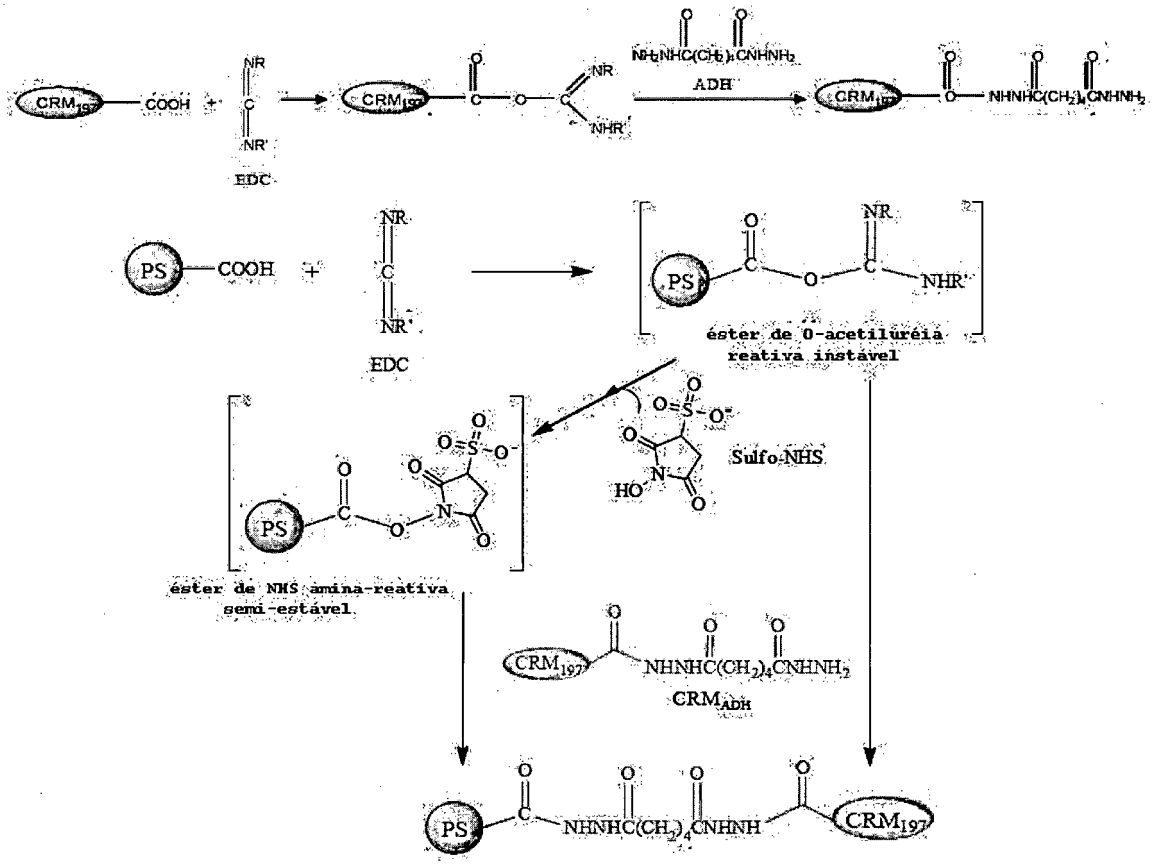

CRM197
COOH
EDC
ADH
PS
éster de O-acetilureia reativa instável
Sulfo-NHS
éster de NHS amina-reativa semi-estável
CRM ADH

FIGURA 2

A)



SDS-PAGE (gel 3-8%)
1. Marcador
2. CRM_{ADH}
3. CPS nativo da mistura de conjugado (5µg)
4. CPS nativo da mistura de conjugado (10µg)

B)

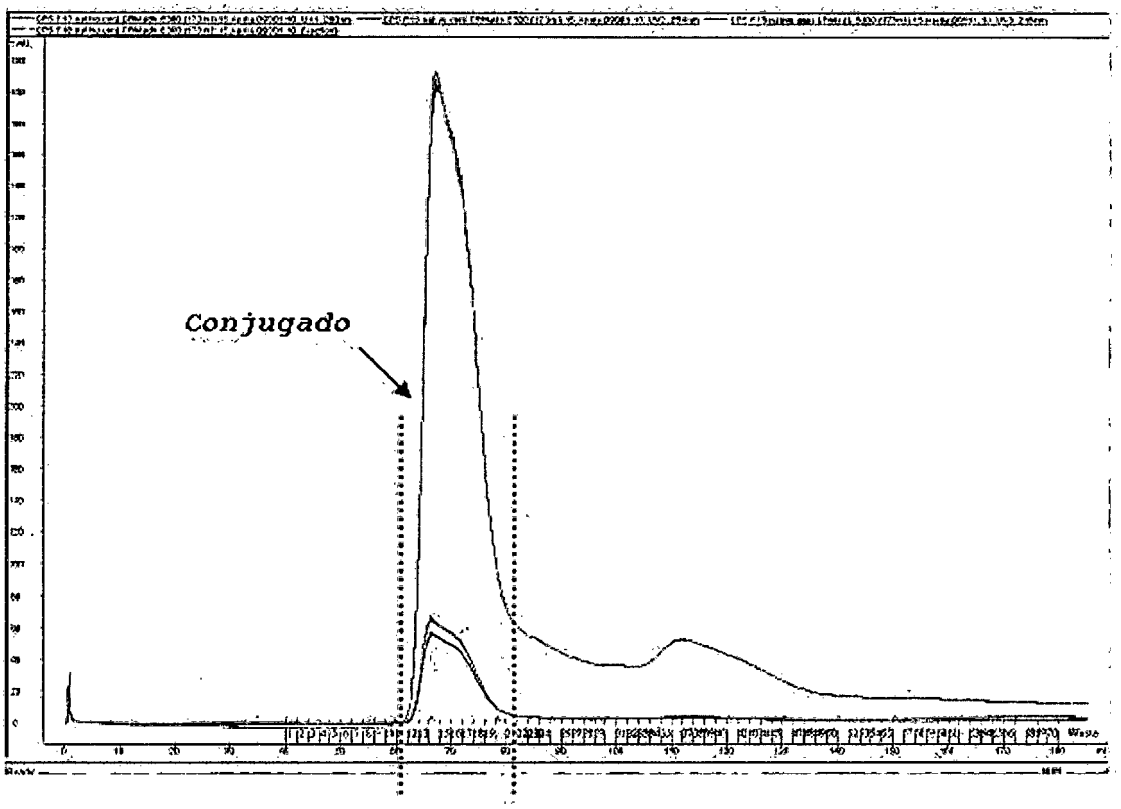


FIGURA 3

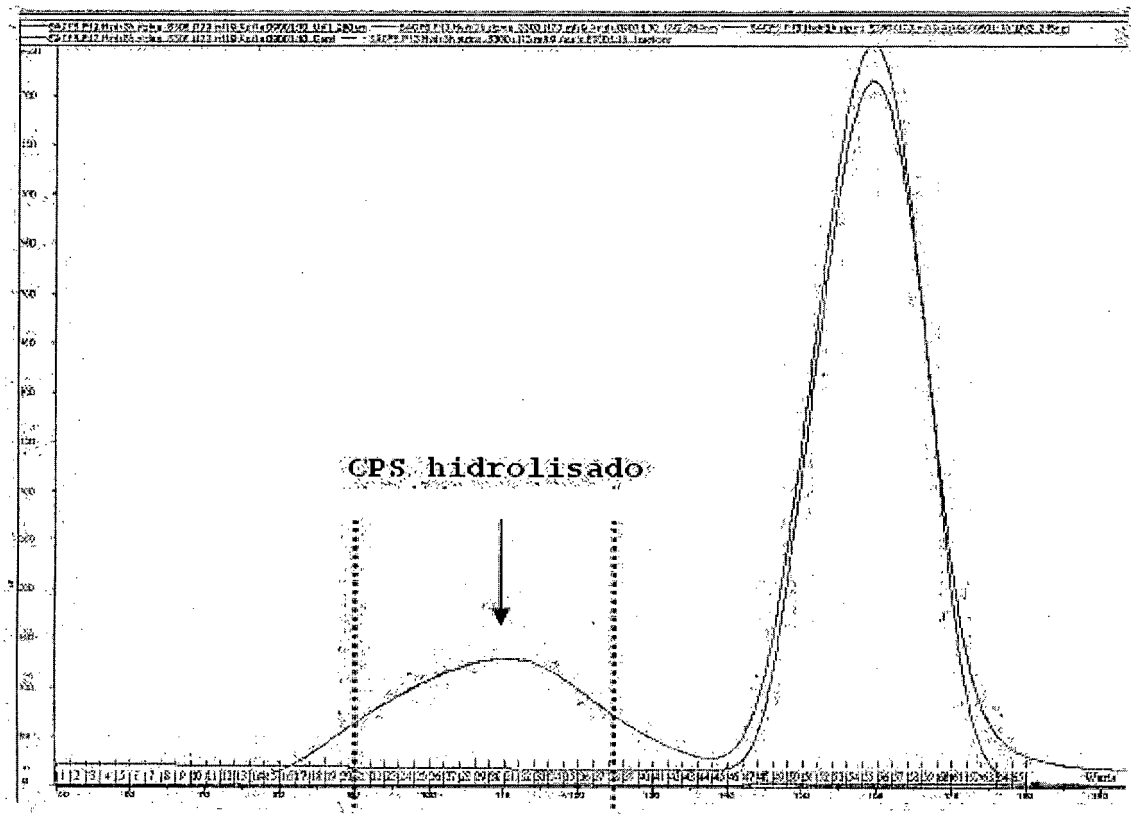


FIGURA 4A

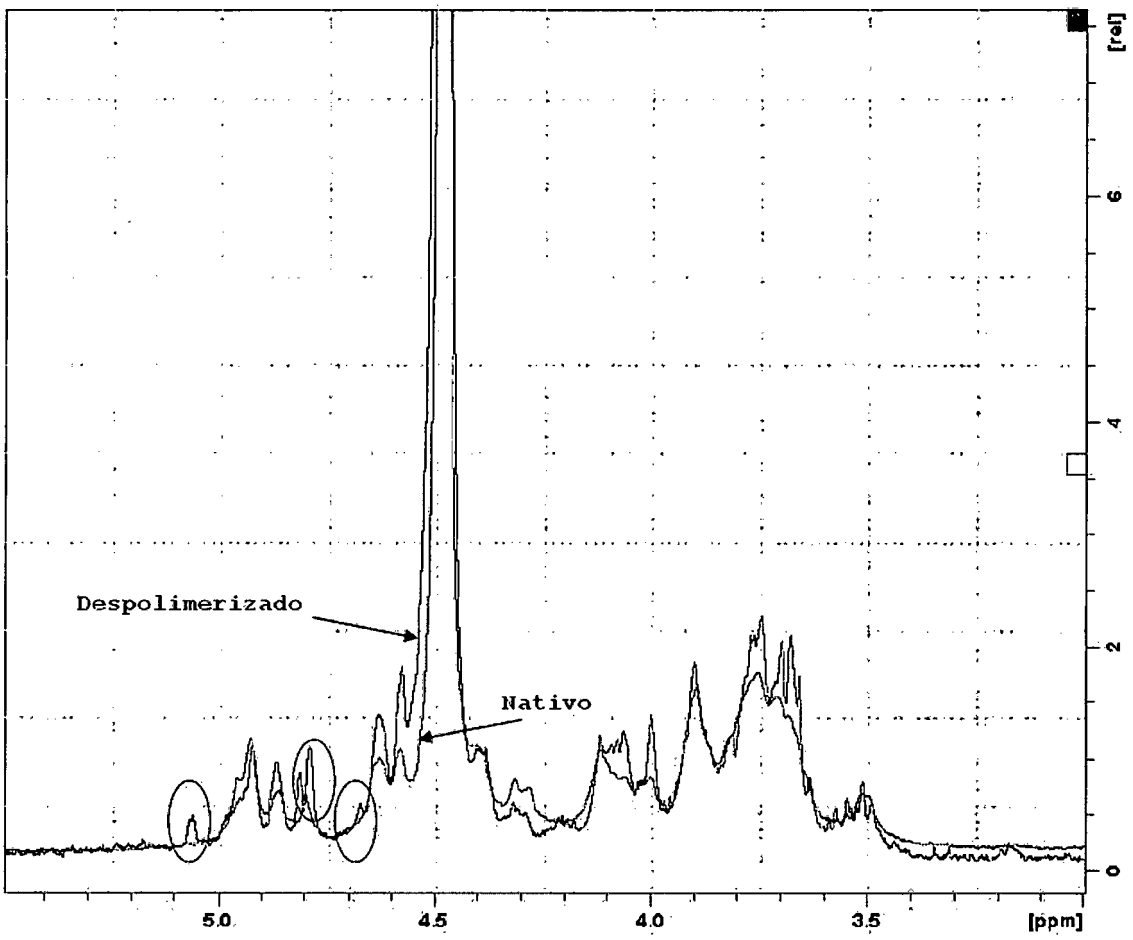


FIGURA 4B

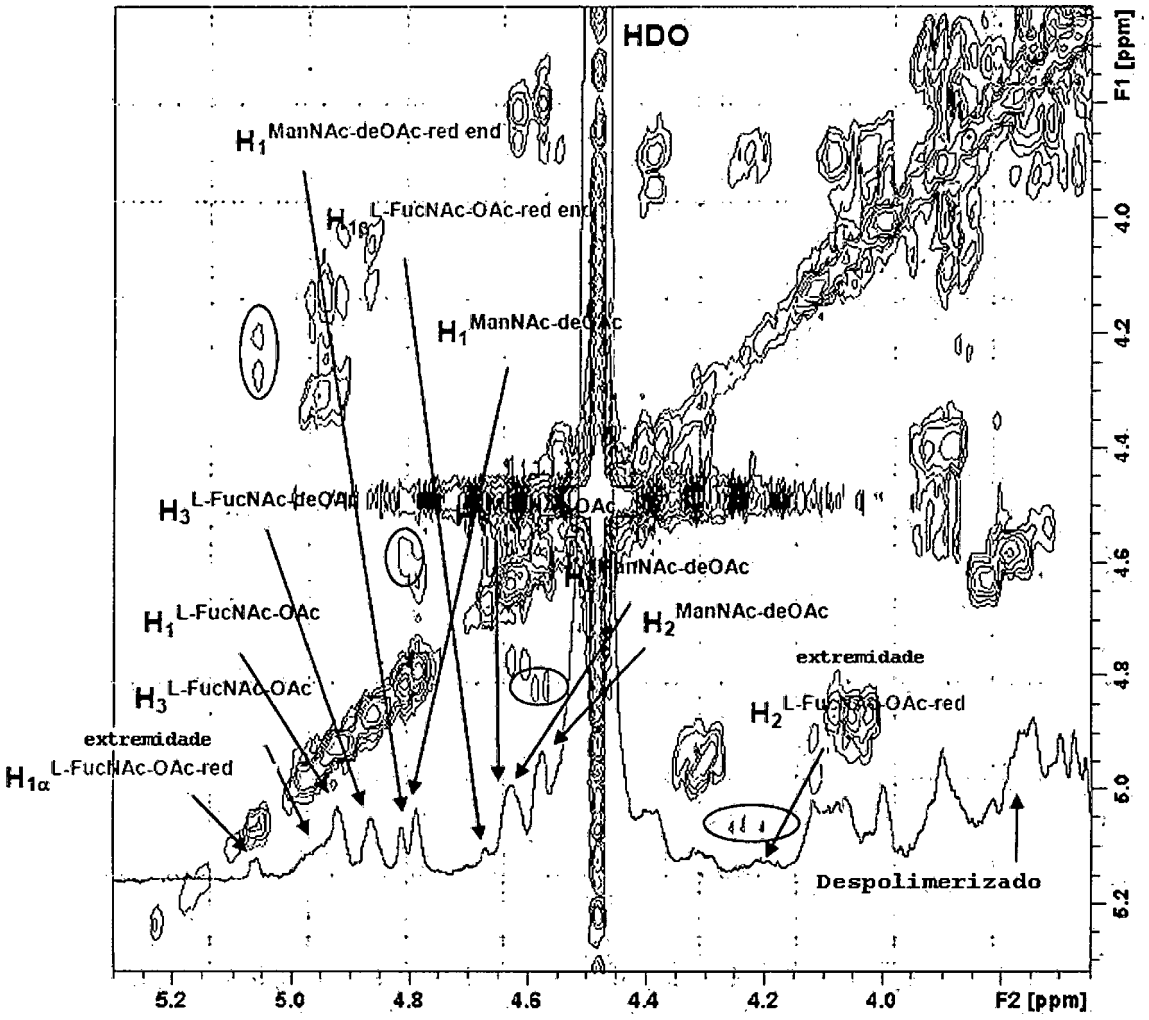

HDO
H1 ManNAc-deOAc-red end
H1α L-FucNAc-OAc-red end
H1 ManNAc-deOAc
H3 L-FucNAc-deOAc
H1 L-FucNAc-OAc
H3 L-FucNAc-OAc
extremidade
H1α L-FucNAc-OAc-red
H2 ManNAc-deOAc
extremidade
H2 L-FucNAc-OAc-red
Despolimerizado
F1 [ppm]
F2 [ppm]
5.2
5.0
4.8
4.6
4.4
4.2
4.0

FIGURA 4C

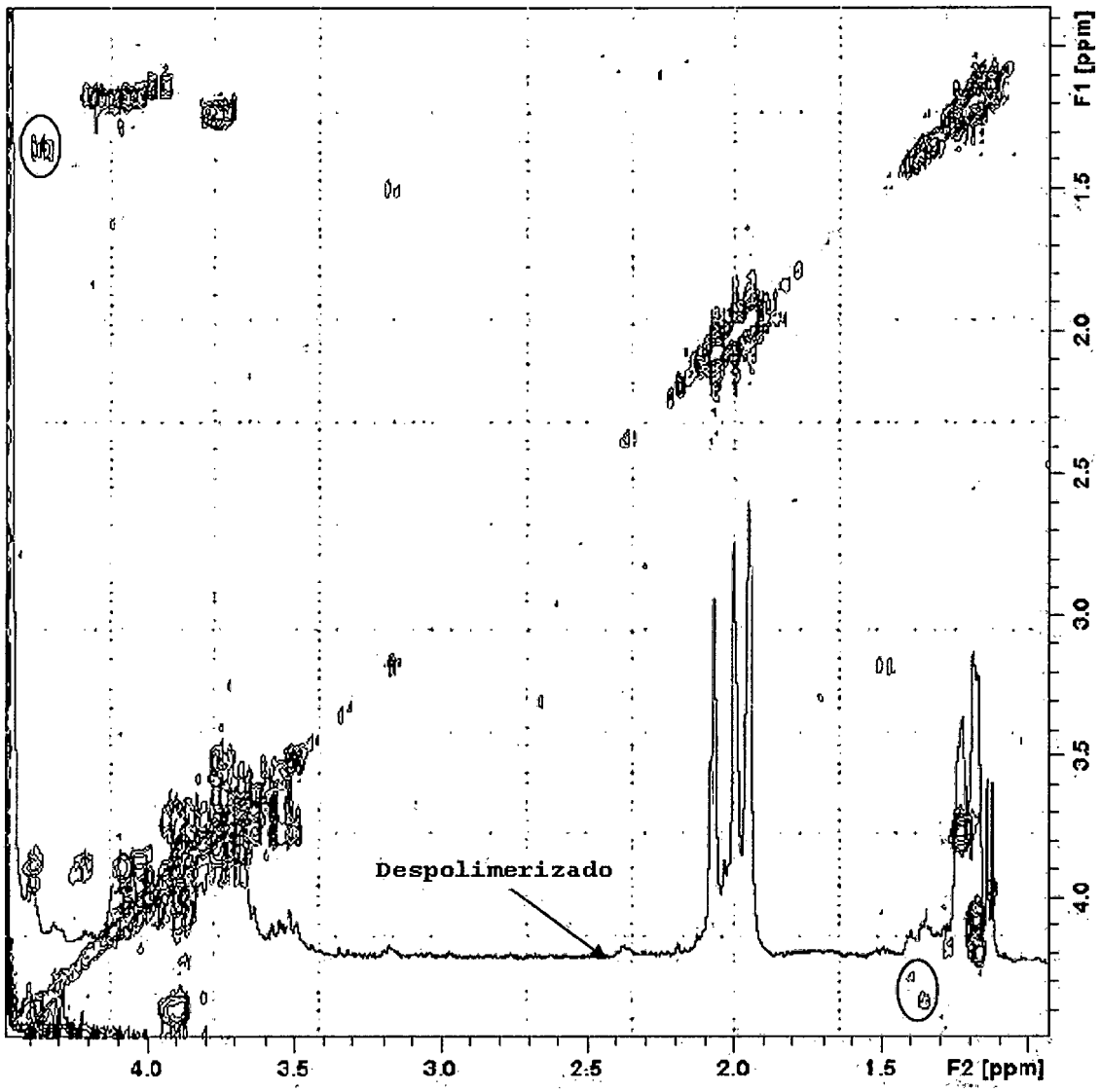
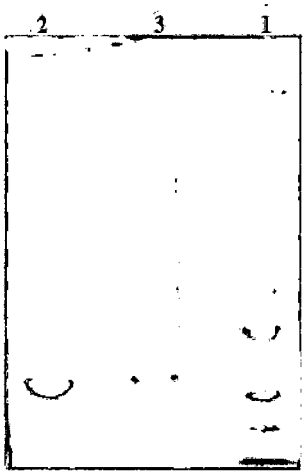


FIGURA 5

A)



SDS-PAGE (gel 3-8%)
1. Marcador
2. CRM
3. Conjugado de CP5-CRM

B)

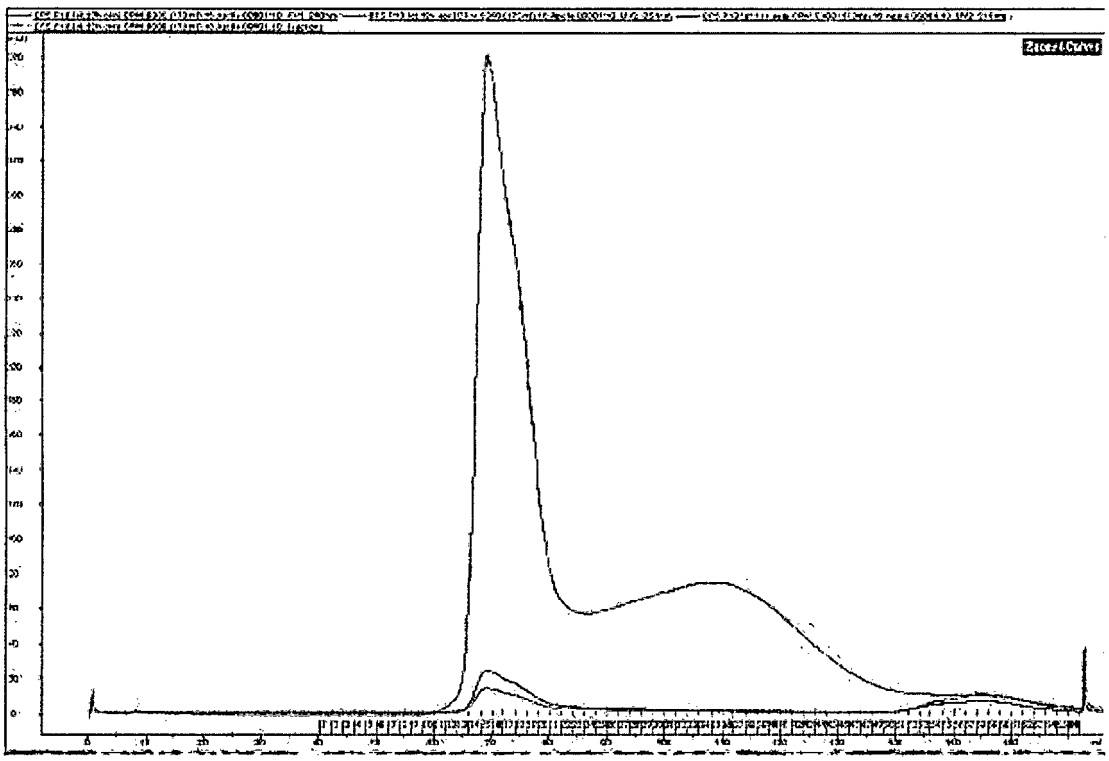


FIGURA 6

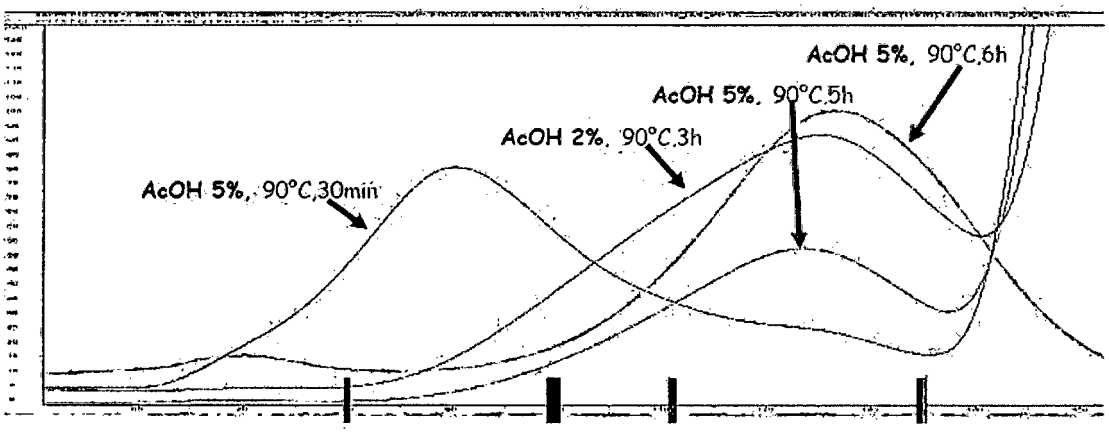
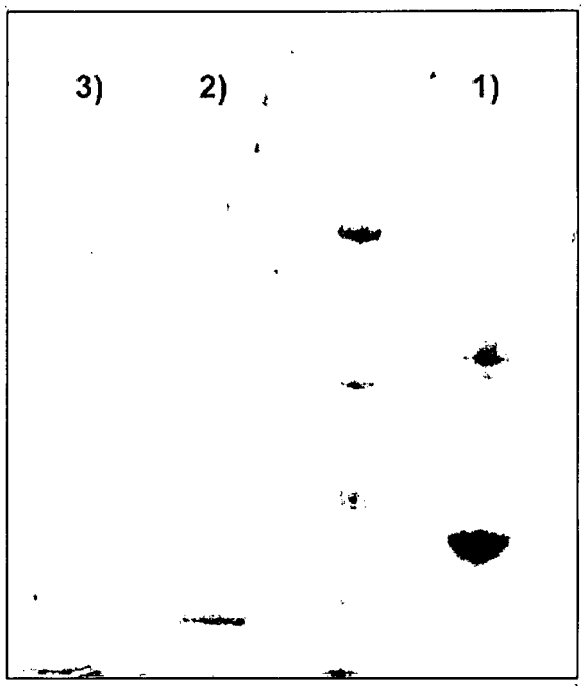


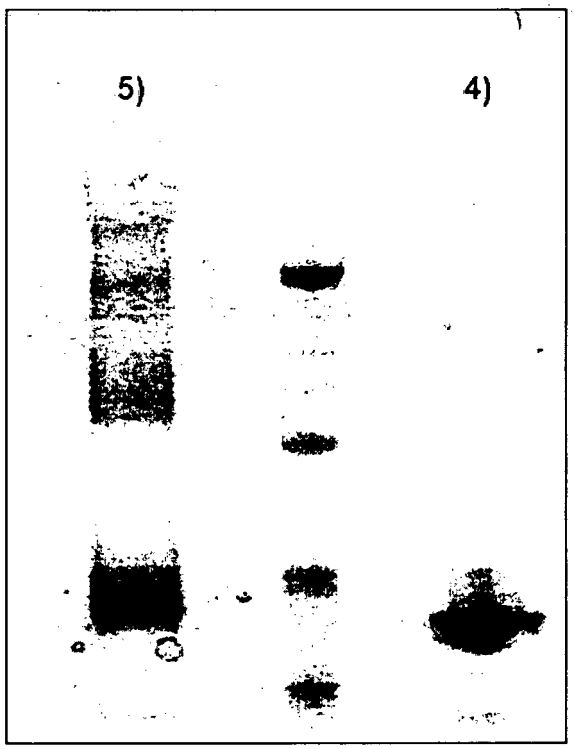
FIGURA 7



1) CRMadh (5 µg)

2) Conjugado de 30'-hidrolisado-CRMadh (2.5 µg)

3) Conjugado de 3h-hidrolisado-CRMadh (2.5 µg)



4) CRM (5 µg)

5) Conjugado de 5h-CRM (2.5 µg)

FIGURA 8

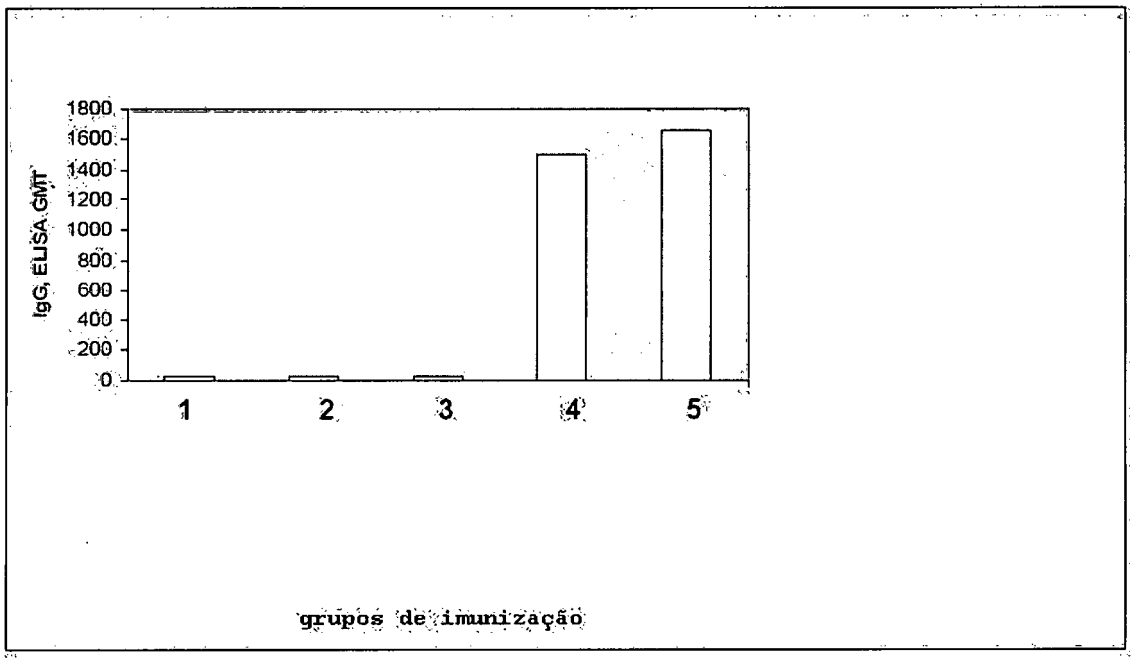

IgG, ELISA GMT
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
1
2
3
4
5
grupos de imunização

FIGURA 9

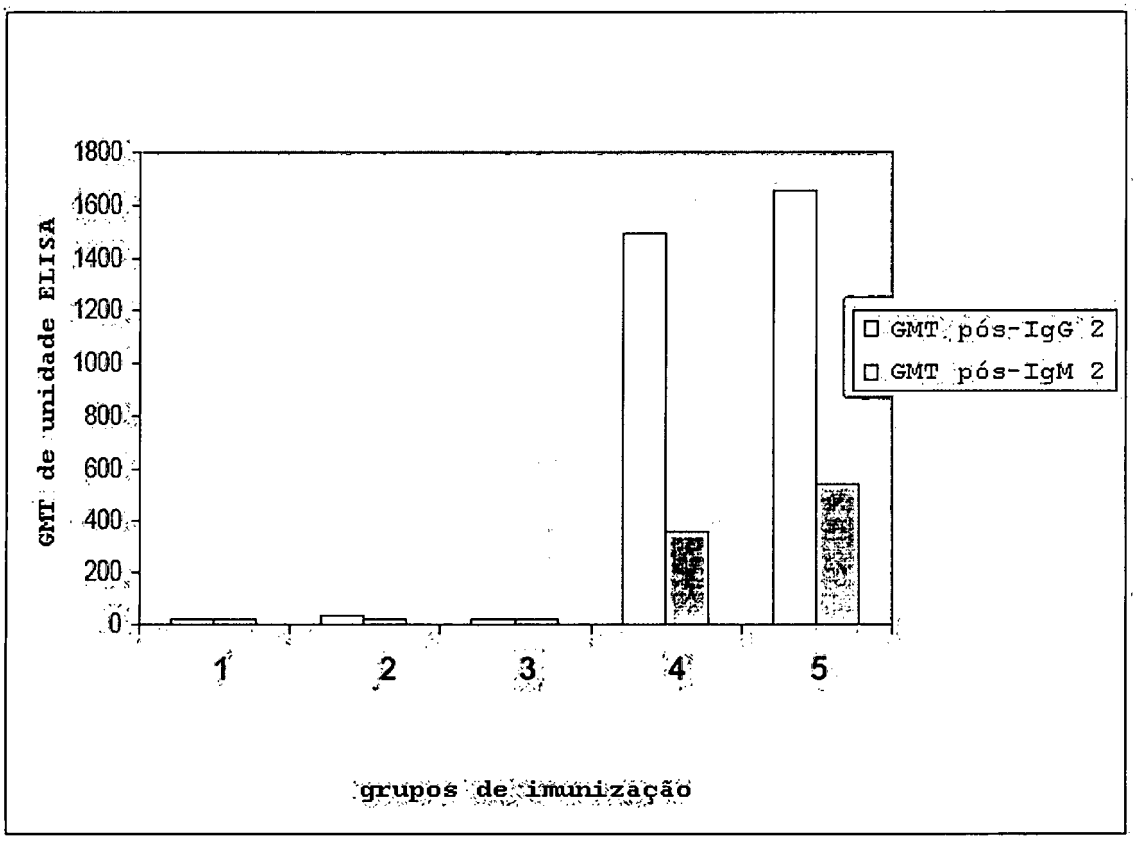

1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
GMT de unidade ELISA
1
2
3
4
5
grupos de imunização
GMT pós-IgG 2
GMT pós-IgM 2

FIGURA 10

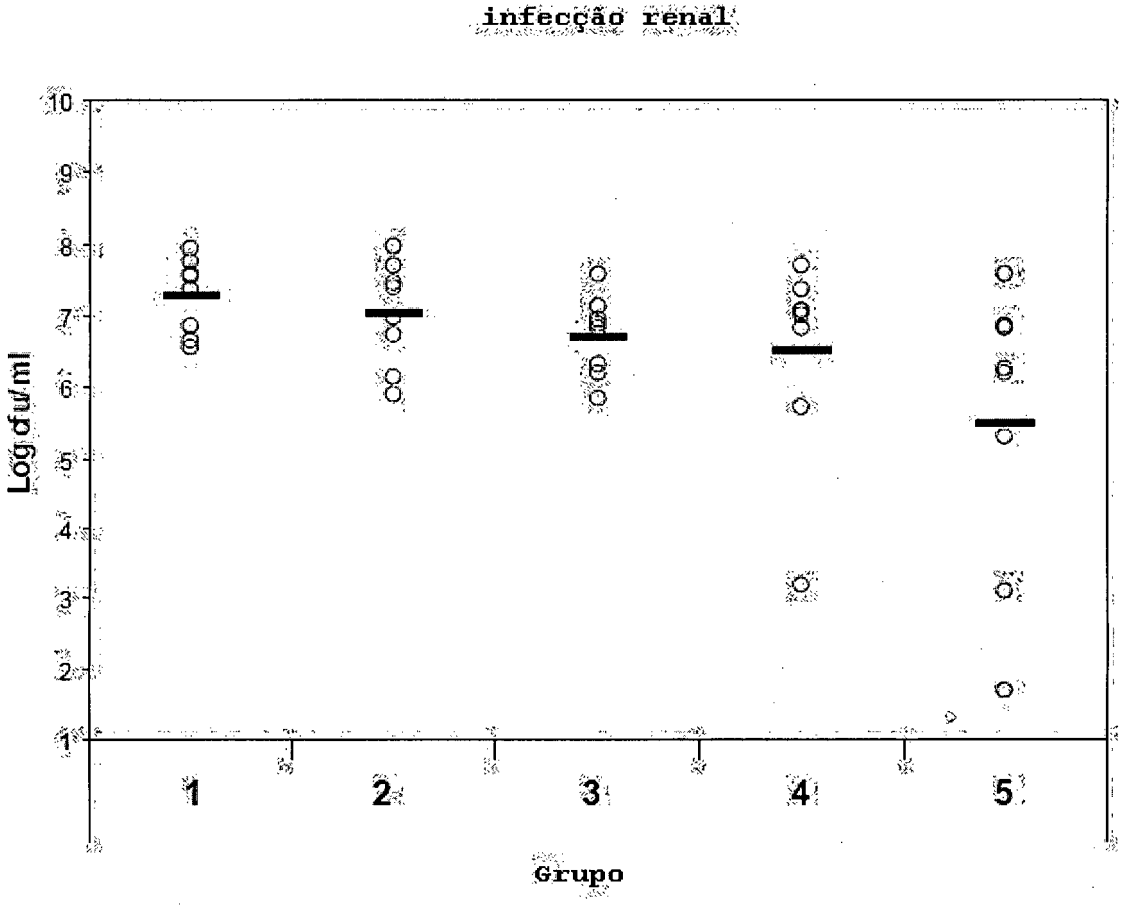


FIGURA 11

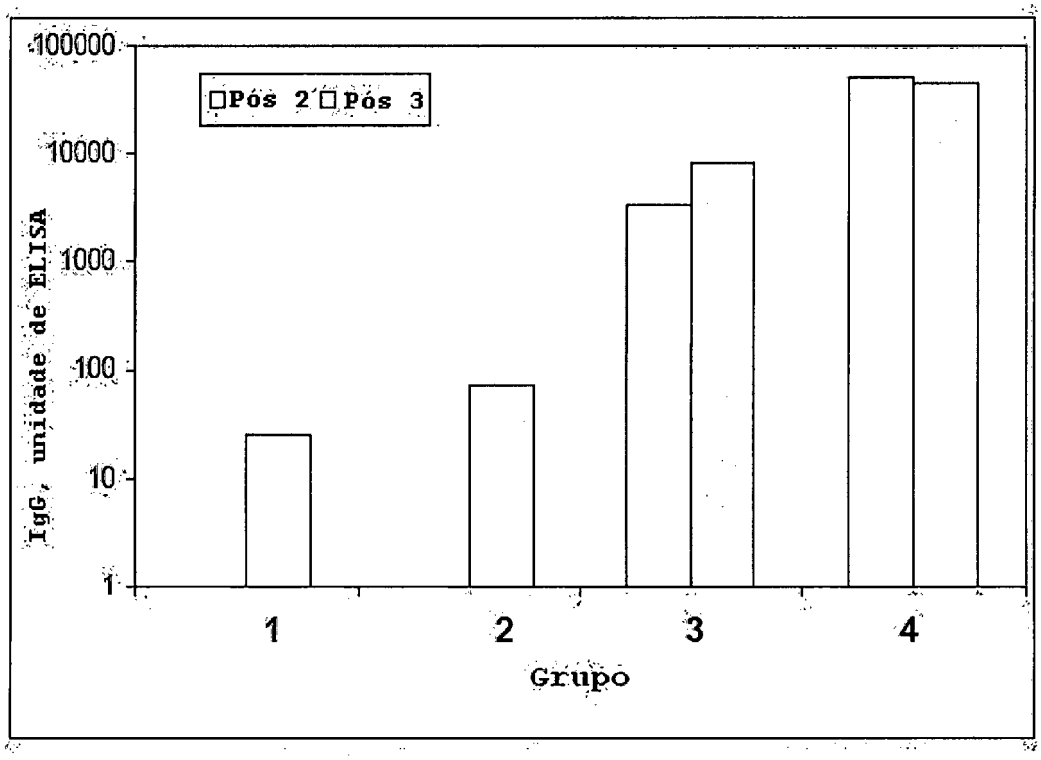

100000
10000
1000
100
10
1
Pós 2
Pós 3
IgG, unidade de ELISA
1
2
3
4
Grupo

FIGURA 12

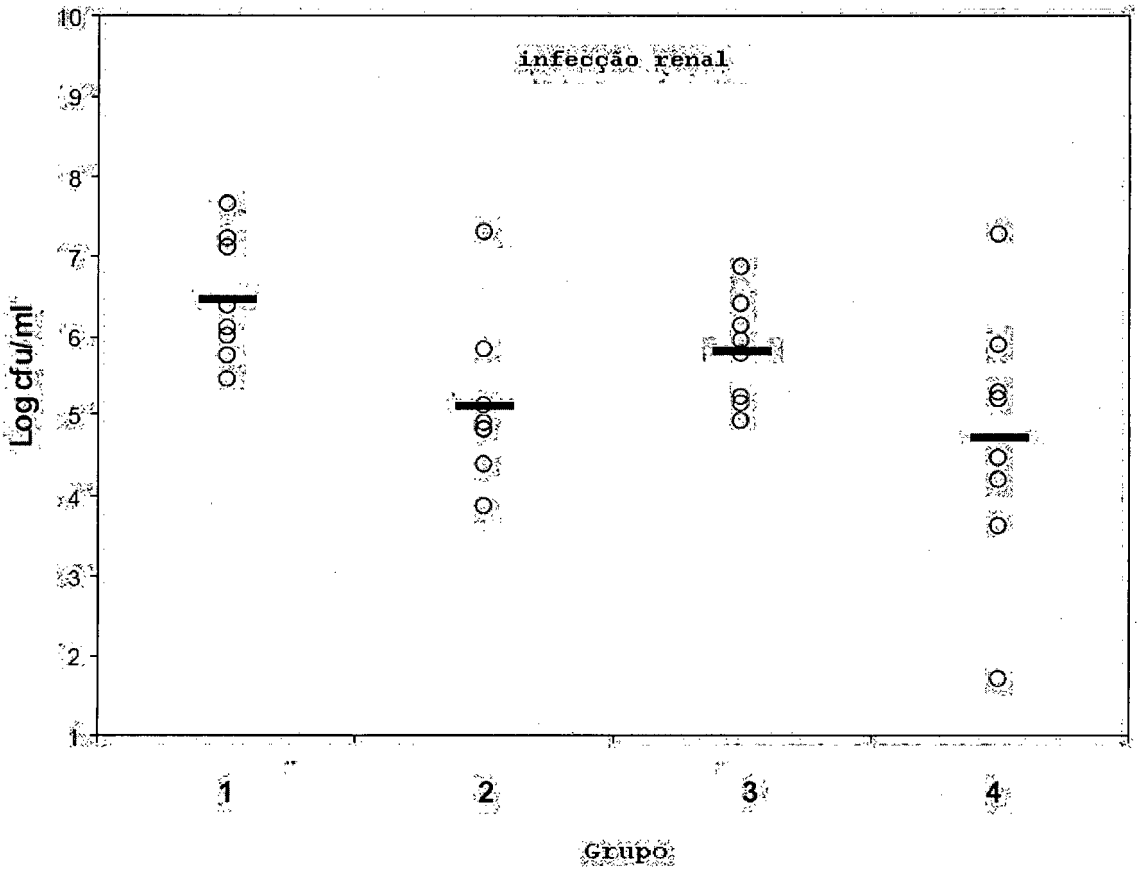


FIGURA 13A

Ataque com crescimento em meio sólido

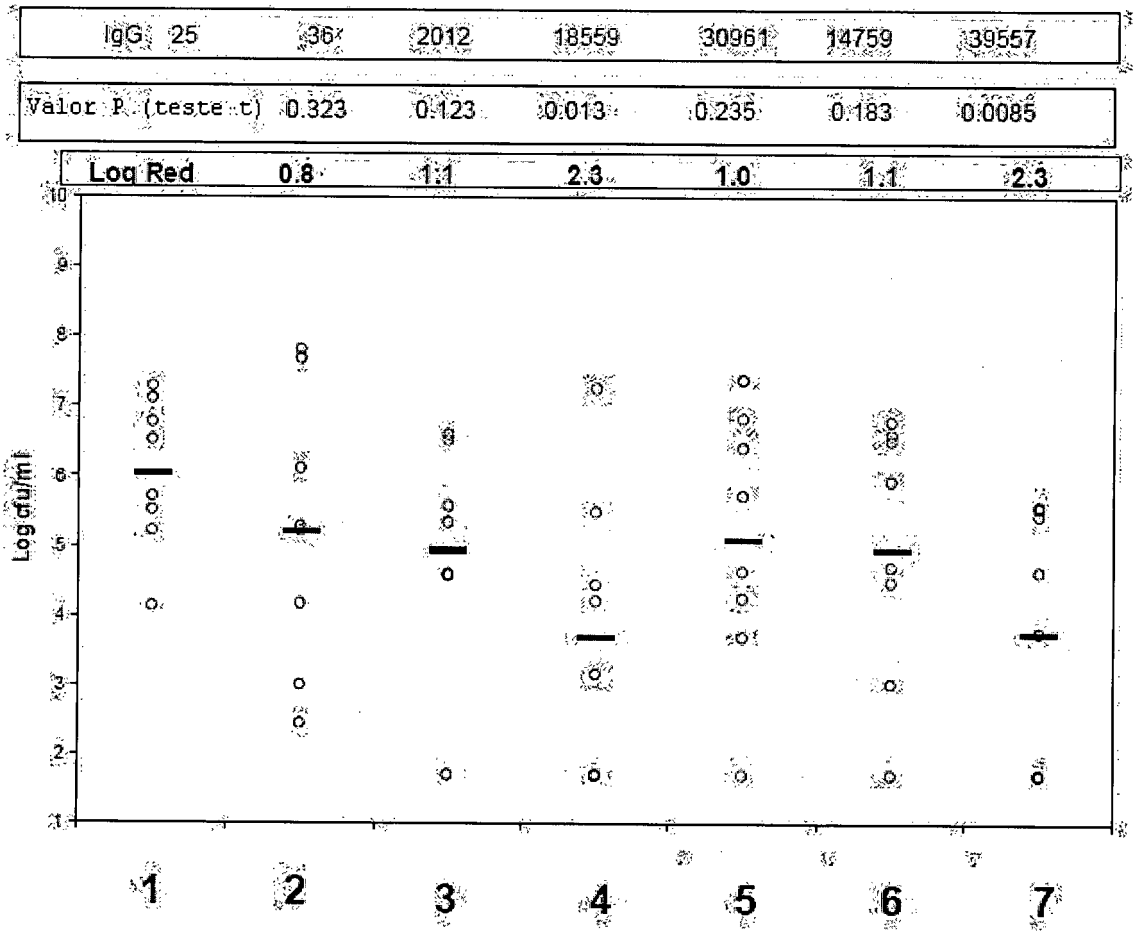


FIGURA 13B

ataque com crescimento em meio líquido

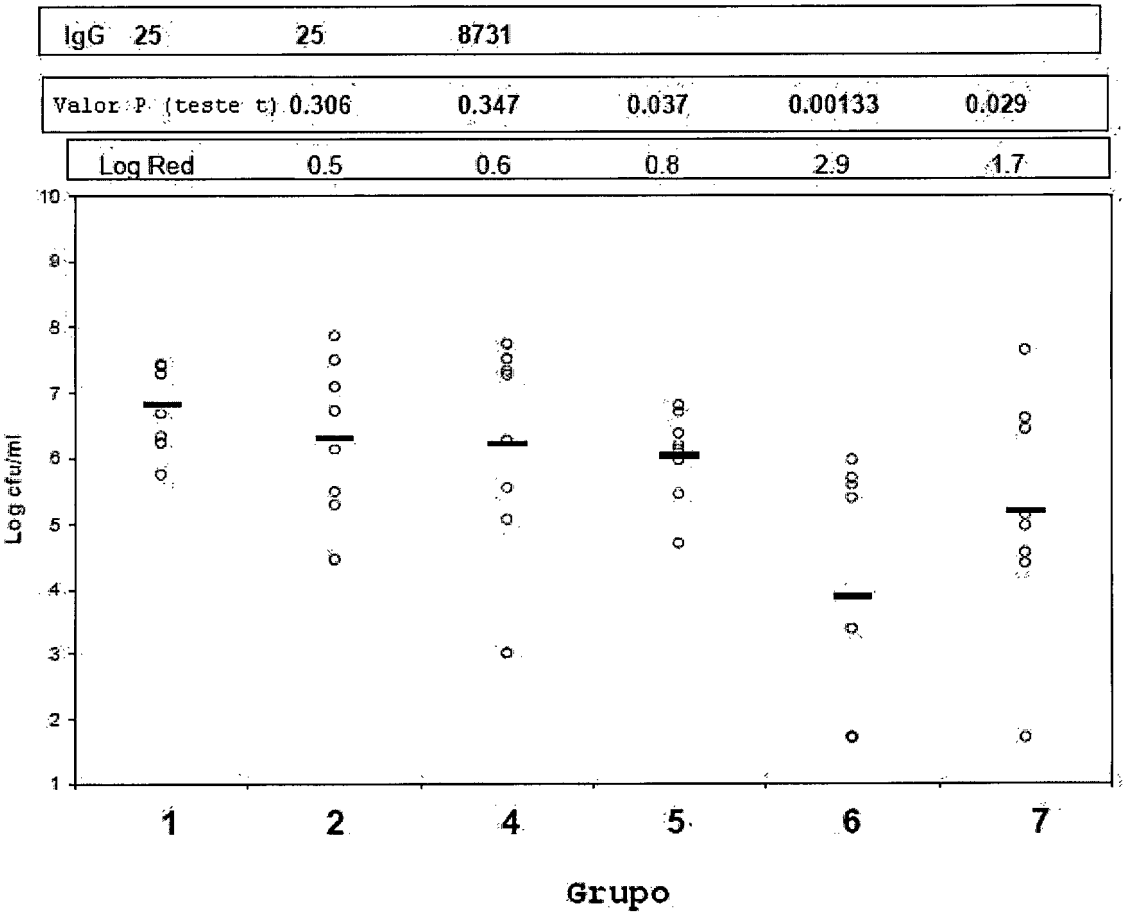
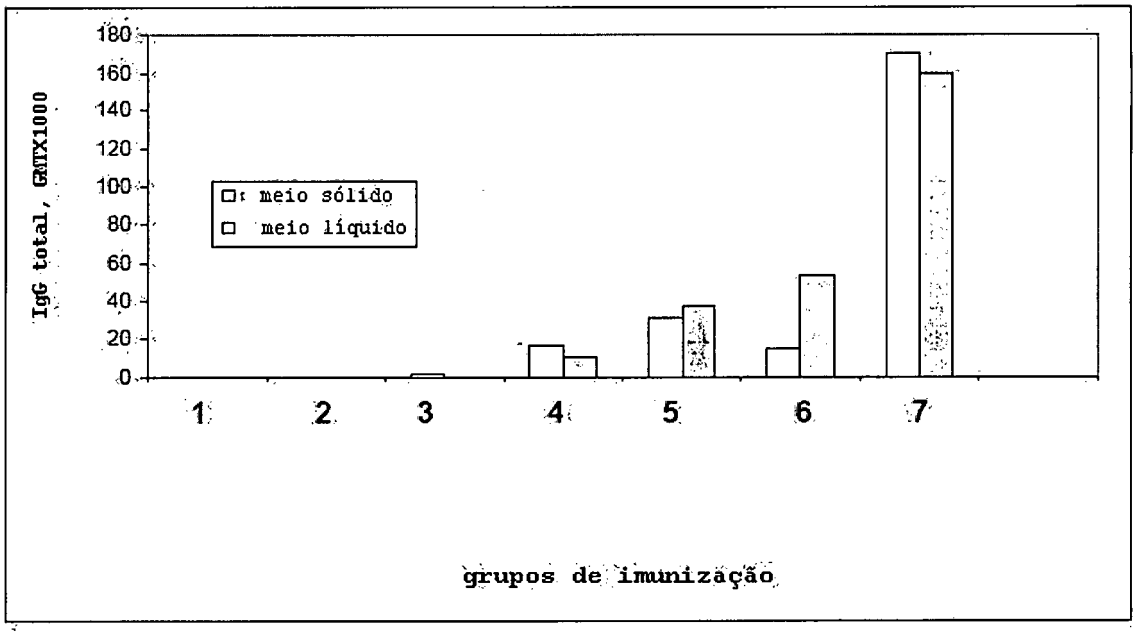


FIGURA 14


IgG total, GMTX1000
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
meio sólido
meio líquido
1
2
3
4
5
6
7
grupos de imunização

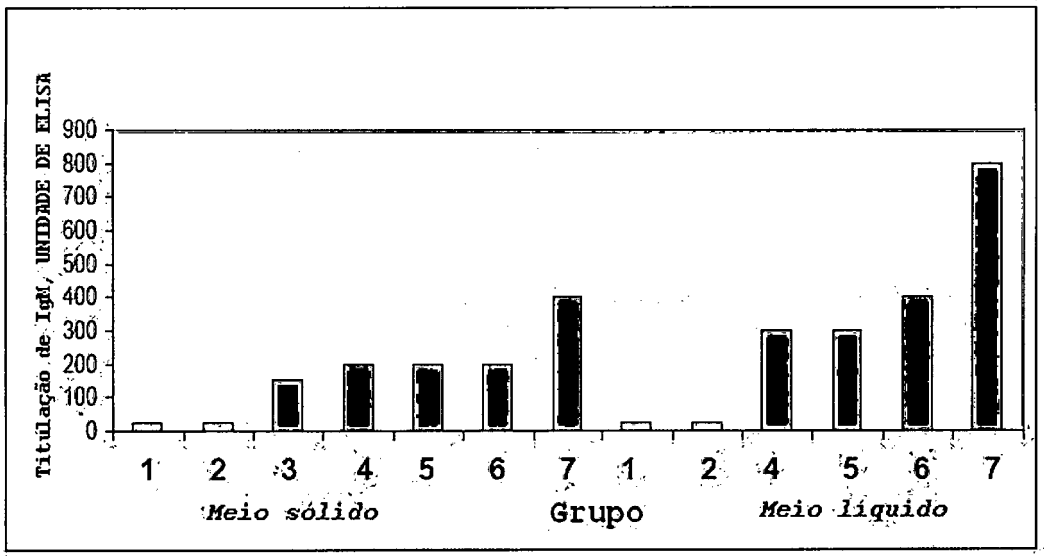

Titulação de IgM, UNIDADE DE ELISA
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
1
2
3
4
5
6
7
1
2
4
5
6
7
Meio sólido
Grupo
Meio líquido

FIGURA 15

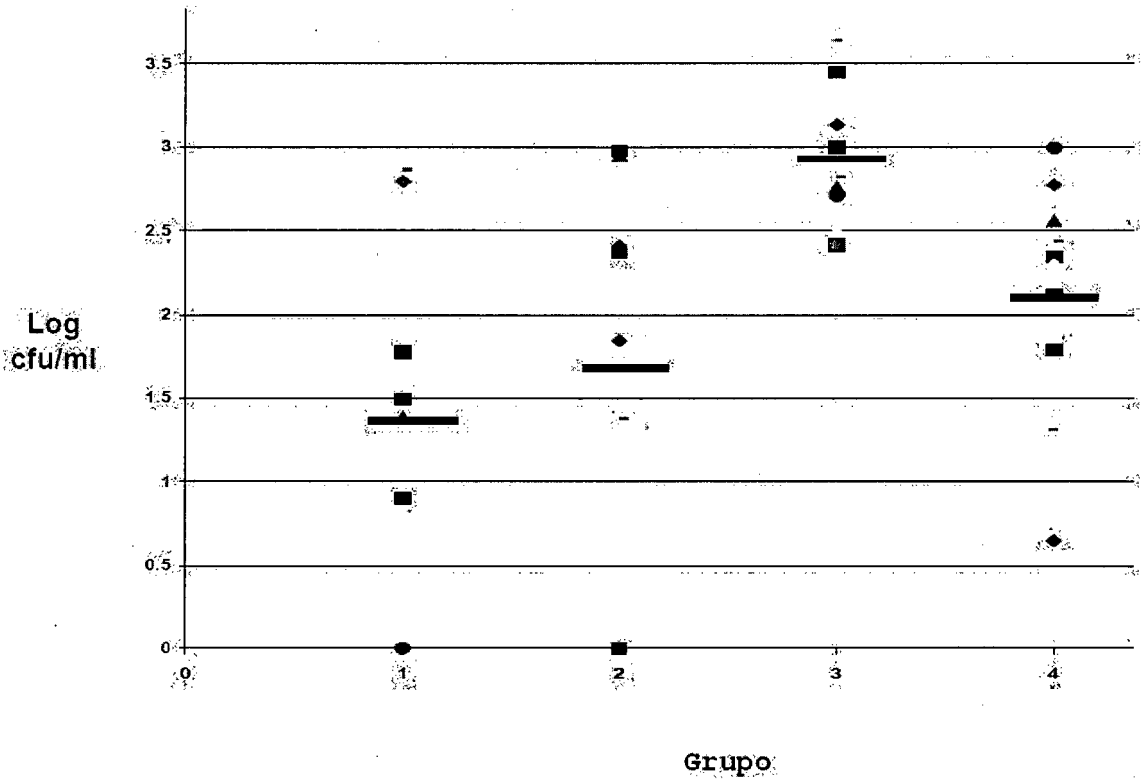


FIGURA 16

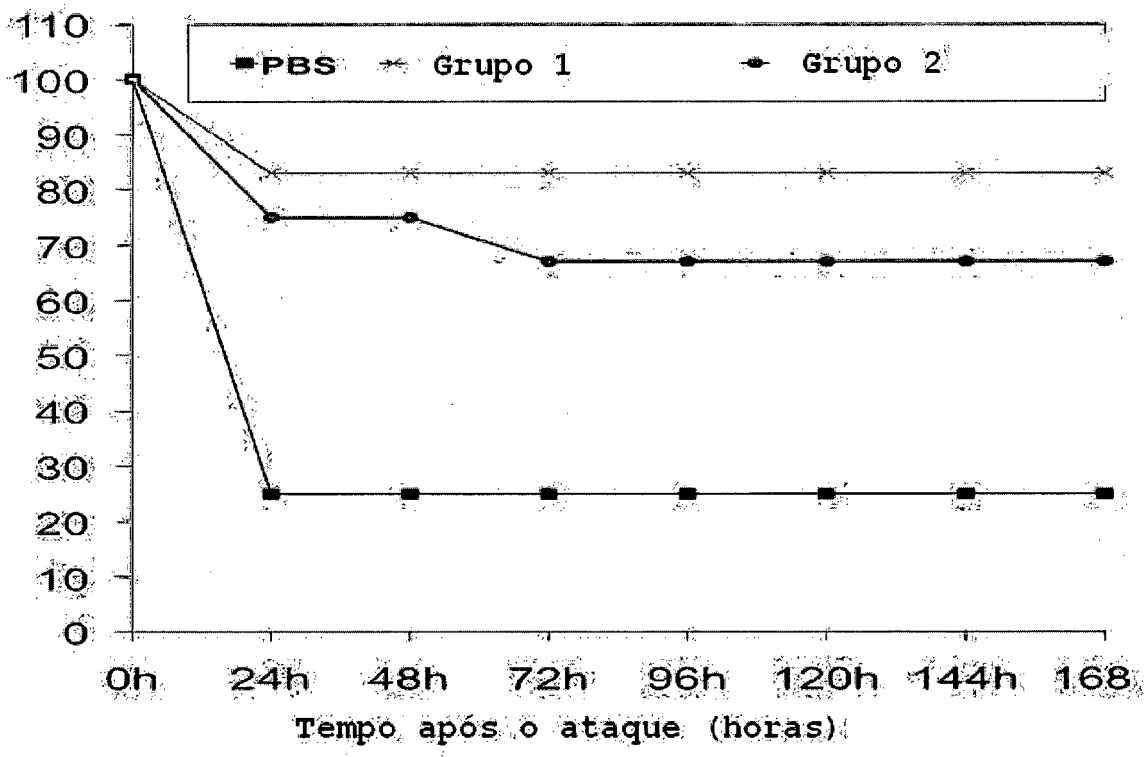

110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
PBS
Grupo 1
Grupo 2
0h
24h
48h
72h
96h
120h
144h
168
Tempo após o ataque (horas)

FIGURA 17

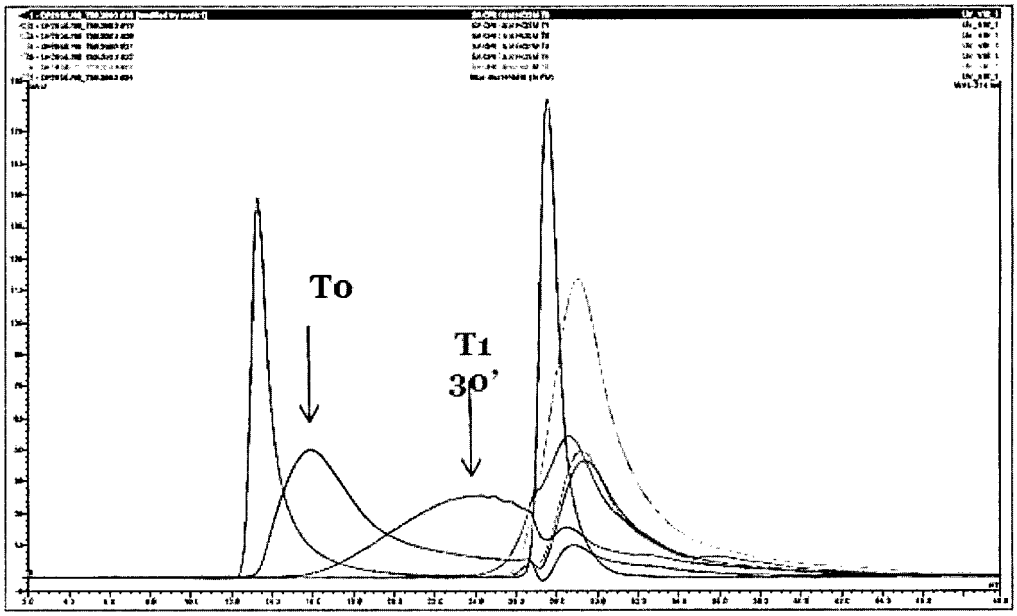
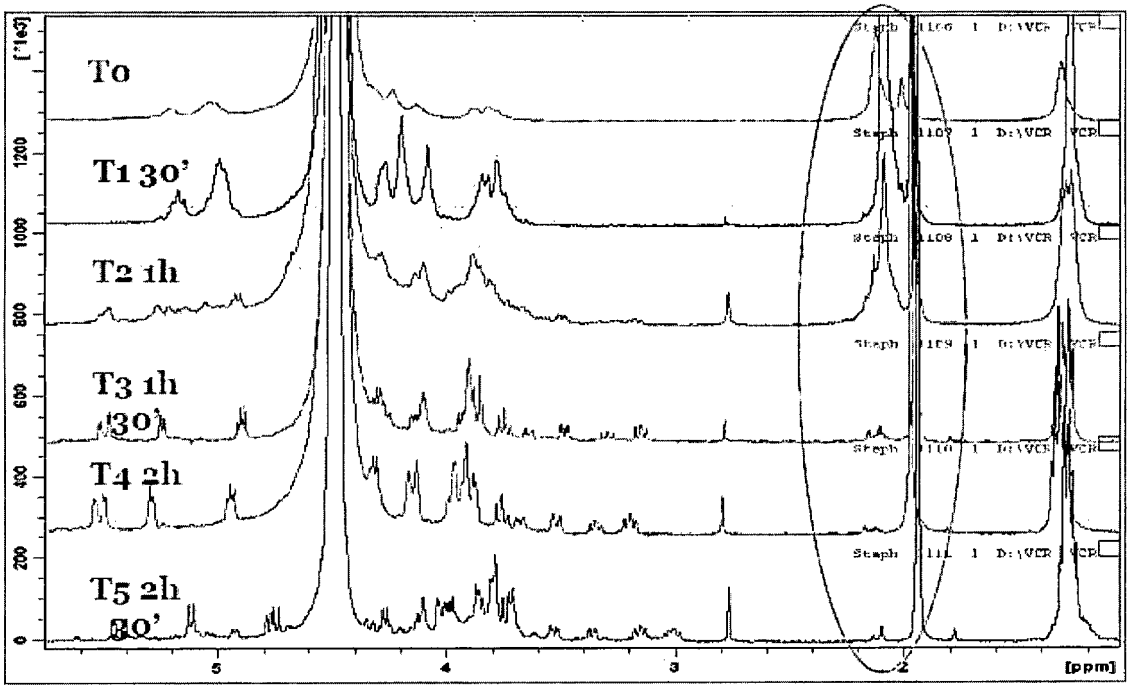


FIGURA 18



RESUMO

CONJUGAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS CAPSULARES DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* DO TIPO 5 E TIPO 8

A invenção fornece um processo para a preparação de um conjugado de um polissacarídeo capsular de *S. aureus* do tipo 5 ou tipo 8 e uma molécula de transporte, que compreende as etapas de: (a) despolimerização do polissacarídeo capsular, para gerar um fragmento de polissacarídeo; (b) oxidação do fragmento a fim de introduzir um grupo aldeído em pelo menos um resíduo sacarídico no fragmento, para gerar um resíduo sacarídico oxidado; e (c) acoplamento do resíduo sacarídico oxidado a uma molécula de transporte por meio do grupo aldeído, gerando, dessa forma, o conjugado. O acoplamento na etapa (c) pode ser direto, ou pode ser por meio de uma molécula vinculadora. A invenção também fornece um conjugado obtido ou passível de obtenção por esse processo.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

Código de Controle

Campo 1



1927ACC613A3B011

Campo 2



5E741EEDB81DF4BA

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 201200459 LIST DE SEQ.txt
- Data de Geração do Código: 29-05-2012
- Hora de Geração do Código: 14:06:52
- Código de Controle:
    - Campo 1: 1927ACC613A3B011
    - Campo 2: 5E741EEDB81DF4BA