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

(21) BR 112021004185-0 A2

(22) Data do Depósito: 12/09/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 25/05/2021

(54) Título: VACINAS DE PROTEÍNA DE FUSÃO PNEUMOCÓCICA

(51) Int. Cl.: A61K 39/09; A61K 39/116.

(30) Prioridade Unionista: 12/09/2018 US 62/730,199.

(71) Depositante(es): THE CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION.

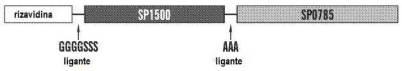
(72) Inventor(es): RICHARD MALLEY; YINGJIE LU; FAN ZHANG.

(86) Pedido PCT: PCT US2019050800 de 12/09/2019

(87) Publicação PCT: WO 2020/056127 de 19/03/2020

(85) Data da Fase Nacional: 05/03/2021

(57) Resumo: VACINAS DE PROTEÍNA DE FUSÃO PNEUMOCÓCICA. A presente invenção refere-se a tecnologias para a prevenção e / ou tratamento de infecções pneumocócicas.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"VACINAS DE PROTEÍNA DE FUSÃO PNEUMOCÓCICA".**

Referência Cruzada a Pedidos Relacionados

[001] Este pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório U.S. 62/730.199 depositado em 12 de setembro de 2018, cujo conteúdo é aqui incorporado em sua totalidade.

Antecedentes

[002] *Streptococcus pneumoniae* continua sendo uma das principais causas de doenças graves, incluindo bacteremia, sepse, meningite e pneumonia, entre crianças e adultos em todo o mundo. A morbidade e mortalidade entre bebês, crianças pequenas, idosos e sujeitos com certas condições médicas subjacentes é alta.

[003] *S. pneumoniae* é um coco Gram-positivo encapsulado que coloniza a nasofaringe em cerca de 5-10% dos adultos saudáveis e 20-40% das crianças saudáveis. A colonização normal torna-se infecciosa quando o *S. pneumoniae* é transportado para as trompas de Eustáquio, seios nasais, pulmões, corrente sanguínea, meninges, espaços articulares, ossos e cavidade peritoneal. A infecção por *S. pneumoniae* é a causa mais frequente de bacteremia, pneumonia, meningite, sinusite e otite média aguda [CDC, 2010].

[004] A doença pneumocócica pode ser invasiva ou não invasiva. A forma mais comum de doença não invasiva, a pneumonia pneumocócica não bacterêmica, continua sendo uma das causas mais frequentes de hospitalizações por pneumonia. A doença pneumocócica invasiva (IPD) é definida como *S. pneumoniae* isolado de um sítio normalmente estéril (*por exemplo*, líquido cefalorraquidiano, sangue, líquido articular, líquido pleural ou líquido peritoneal). A maior incidência de IPD é encontrada nos extremos da idade - em adultos idosos e em crianças menores de 2 anos de idade. Nos Estados Unidos, antes do advento da primeira vacina pneumocócica, o *S. pneumoniae* causou

aproximadamente 17.000 casos de doença invasiva a cada ano entre crianças menores de 5 anos de idade, incluindo 700 casos de meningite e 200 mortes [CDC, 2000]. As taxas de morbidade e mortalidade mais altas foram relatadas nos países em desenvolvimento, mas a carga da doença também é considerável nos países industrializados.

[005] *S. pneumoniae* possui vários fatores de virulência que permitem ao organismo escapar do sistema imunológico. Os exemplos incluem uma cápsula de polissacarídeo que evita a fagocitose pelas células imunes do hospedeiro, proteases que inibem a opsonização mediada pelo complemento e proteínas que causam a lise das células hospedeiras. Na cápsula de polissacarídeo, a presença de polissacarídeos complexos forma a base para a divisão dos pneumococos em diferentes sorotipos. Até a data, foram identificados cerca de 100 sorotipos de *S. pneumoniae*.

[006] Duas vacinas para *S. pneumoniae* estão atualmente disponíveis nos EUA: Vacina Conjugada Pneumocócica (PCV13 ou Prevnar 13®) e Vacina Polissacarídica Pneumocócica (PPSV23 ou Pneumovax®). A PCV13 não pode conferir proteção contra a maioria dos sorotipos conhecidos de *S. pneumoniae*. Embora a PPSV23 inclua componentes polissacarídicos de mais sorotipos de *S. pneumoniae* do que a PCV13, ela induz uma resposta imune que não é duradoura nem anamnéstica após o desafio subsequente. A PPSV23 protege adultos e idosos contra doenças pneumocócicas invasivas; no entanto, nenhum efeito consistente foi observado na prevenção da pneumonia [Gruber *et al*, 2008].

[007] Assim, existe uma necessidade médica de uma vacina que forneça imunidade dependente de células T contra uma ampla faixa de sorotipos de *S. pneumoniae.*

Sumário

[008] A presente divulgação aborda a falta de tecnologias

adequadas para a prevenção e/ou tratamento da infecção pneumocócica. Entre outras coisas, a presente divulgação aborda desafios no fornecimento de vacinas com imunogenicidade suficiente para proteger contra a doença pneumocócica invasiva e pneumonia. As tecnologias aqui descritas podem induzir uma resposta de células T e B e/ou fornecer imunidade contra uma ampla faixa de sorotipos de *S. pneumoniae*, incluindo um ou mais sorotipos não incluídos em vacinas disponíveis comercialmente, *por exemplo*, PCV13 ou PPSV23.

[009] Em algumas modalidades, uma proteína de fusão aqui descrita, quando administrada a um sujeito, pode induzir uma resposta Th17 superior em pelo menos 25% ou mais incluindo, *por exemplo*, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou mais, em comparação com a induzida por componentes antigênicos individuais da proteína de fusão. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão aqui descrita, quando administrada a um sujeito, pode induzir uma resposta Th17 superior em pelo menos 1,1 vezes ou mais, incluindo, *por exemplo*, pelo menos 1,2 vezes, pelo menos 1,3 vezes, pelo menos 1,4 vezes, pelo menos 1,5 vezes, pelo menos 2 vezes, pelo menos 3 vezes, pelo menos 4 vezes, pelo menos 5 vezes, pelo menos 10 vezes ou mais, em comparação com aquela induzida por componentes antigênicos individuais da proteína de fusão.

[010] Em algumas modalidades, uma proteína de fusão aqui descrita, quando administrada a um sujeito, pode induzir uma resposta imune a um ou mais sorotipos pneumocócicos não vacinais representativos que não estão incluídos em uma vacina comercialmente disponível, *por exemplo*, PCV13 ou PPSV23. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão aqui descrita, quando administrada a um sujeito, pode induzir uma resposta imune a um ou mais sorotipos pneumocócicos não vacinais selecionados do grupo que consiste em

6B, 16F, 15A e 35B.

Breve Descrição dos Desenhos

[011] Os presentes ensinamentos descritos neste documento serão mais completamente compreendidos a partir da seguinte descrição de várias modalidades ilustrativas, quando lidos em conjunto com os desenhos anexos. Deve ser entendido que os desenhos descritos abaixo são apenas para fins ilustrativos e não se destinam a limitar o escopo dos presentes ensinamentos de forma alguma.

[012] A Figura 1 é um esquema de uma proteína de fusão CP1 exemplificativa. Tal proteína de fusão CP1 exemplificativa compreende uma proteína de ligação à biotina, tal como*por exemplo*, uma proteína rizavidina truncada (*por exemplo*, aminoácidos 45-179 de uma proteína rizavidina de tipo selvagem (denotado Rhavi)), um primeiro ligante *(por exemplo*, um ligante GGGGSSS), um polipeptídeo SP1500 (*por exemplo*, aminoácidos 27-278 da proteína *S. pneumoniae* SP1500), um segundo ligante (*por exemplo*, a sequência de aminoácidos ou ligante AAA) e um polipeptídeo SP0785 *(por exemplo*, aminoácidos 33-399 da proteína de *S. pneumoniae* SP0785). Em algumas modalidades, uma proteína de fusão CP1 pode compreender ainda uma etiqueta His. Para um ligante GGGGSSS, a sequência de aminoácidos SSS pode ser do sítio Sac I em um plasmídeo PET21 / 24b, com a sequência de aminoácidos GGGG adicionada para criar um ligante flexível com impedimento estérico mínimo. Alternativamente, o ligante GGGGSSS pode ser sintetizado. A sequência de aminoácidos AAA pode ser do sítio Not I em um plasmídeo PET21 / 24b ou sintetizada.

[013] A Figura 2 ilustra as respostas imunes aos componentes do polipeptídeo SP1500 e SP0785 de uma proteína de fusão CP1 exemplificativa. O painel esquerdo mostra a resposta Th17 a um polipeptídeo SP1500 e um polipeptídeo SP0785 de uma proteína de fusão CP1 exemplificativa. As respostas Th17 são mostradas como

concentração média geométrica de IL-17A secretada no meio após estimulação de amostras de sangue periférico de camundongos imunizados com toxina da cólera sozinha, ou com um polipeptídeo SP1500 ou SP0785 adjuvado com toxina da cólera. Cada ponto no gráfico representa IL-17A secretado para um camundongo. O painel direito mostra proteção contra colonização por *S. pneumoniae* após imunização com toxina da cólera sozinha, ou com um polipeptídeo SP1500 ou SP0785 adjuvado com toxina da cólera e desafio intranasal com *S. pneumoniae.* Cada ponto no gráfico representa *S. pneumoniae* CFU por lavagem nasal para um camundongo. As barras horizontais em ambos os painéis representam a média geométrica de IL-17A secretado (painel esquerdo) e a média geométrica de CFU por lavagem nasal para cada grupo (painel direito), respectivamente. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste U de Mann-Whitney. CT: toxina da cólera; CFU: unidade formadora de colônias; ELISA: ensaio imunossorvente ligado à enzima; IL-17A: interleucina 17A. **p <0,01; *** p<0,001.

[014] A Figura 3 ilustra respostas imunes a uma proteína de fusão CP1 exemplificativa. O painel esquerdo mostra a resposta Th17 a uma proteína de fusão CP1 exemplificativa. As respostas Th17 são mostradas como concentração média geométrica de IL-17 secretada no meio após estimulação de amostras de sangue periférico de camundongos imunizados com uma proteína rizavidina truncada (Rhavi) ou com CP1, ambos adjuvados com toxina da cólera. Cada ponto no gráfico representa IL-17A secretado para um camundongo. O painel direito mostra a proteção contra a colonização por *S. pneumoniae* após imunização com uma proteína rizavidina truncada (Rhavi), CP1 ou células inteiras pneumocócicas mortas (inativadas) (WCC), adjuvadas com toxina da cólera e desafio intranasal com *S. pneumoniae.* Cada ponto no gráfico representa *S. pneumoniae* CFU por lavagem nasal para

um camundongo. As barras horizontais em ambos os painéis representam a média geométrica de IL-17A secretado (painel esquerdo) e a média geométrica de CFU por lavagem nasal para cada grupo (painel direito), respectivamente. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste U de Mann-Whitney. CT: toxina da cólera; CFU: unidade formadora de colônias; IL-17A: interleucina 17A; rhavi: proteína de rizavidina truncada; (aminoácidos 45-179 de uma proteína de rizavidina de comprimento completo). *** p <0,001.

[015] A Figura 4 ilustra a presença de anticorpos funcionais contra um sorotipo representativo de *S. pneumoniae* (*por exemplo*, sorotipo 6B) em soros imunes CP1. O sorotipo 6B de *S. pneumoniae* foi incubado em um ensaio opsonofagocítico concentrado modificado (COPA) com soro pré-imune (P0) e imune (P3) inativado por calor, em várias diluições, de cada um dos dois coelhos (87 e 88) imunizados com CP1 adjuvado com fosfato de alumínio. As unidades formadoras de colônias (CFU) para cada diluição e combinação de soros foram enumeradas em placas de ágar de sangue após incubação durante a noite. A presença de anticorpos funcionais é demonstrada pela morte de *S. pneumoniae*, *isto é*, a redução de CFUs após incubação com soro imune. Cada barra vertical no gráfico representa CFU/ml para cada amostra do soro CP1 indicado e diluição, no ponto de tempo indicado (parte inferior do gráfico).

[016] A Figura 5 ilustra a presença de anticorpos funcionais contra um sorotipo representativo de *S. pneumoniae* (*por exemplo*, sorotipo 15A) em soros imunes CP1. O sorotipo 15A de*S. pneumoniae* foi incubado em um ensaio opsonofagocítico concentrado modificado (COPA) com soro pré-imune (P0) e imune (P3) inativado por calor, em diluição 1/2, de cada um dos dois coelhos (87 e 88) imunizados com CP1 adjuvado com fosfato de alumínio. As unidades formadoras de colônias (CFU) para cada soro foram enumeradas em placas de ágar

de sangue após incubação durante a noite. A presença de anticorpos funcionais é demonstrada pela morte de *S. pneumoniae*, *isto é*, a redução de CFUs após incubação com soro imune. Cada barra vertical no gráfico representa CFU / ml para cada amostra do soro CP1 indicado, no ponto de tempo indicado (parte inferior do gráfico).

[017] A Figura 6 ilustra a presença de anticorpos funcionais contra um sorotipo representativo de *S. pneumoniae* (*por exemplo*, sorotipo 35B) em soros imunes CP1. O sorotipo 35B de *S. pneumoniae* foi incubado em um ensaio opsonofagocítico concentrado modificado (COPA) com soro pré-imune (P0) e imune (P3) inativado por calor, em diluição 1/2, de cada um dos dois coelhos (87 e 88) imunizados com CP1 adjuvado com fosfato de alumínio. As unidades formadoras de colônias (CFU) para cada soro foram enumeradas em placas de ágar de sangue após incubação durante a noite. A presença de anticorpos funcionais é demonstrada pela morte de *S. pneumoniae*, *isto é*, a redução de CFUs após incubação com soro imune. Cada barra vertical no gráfico representa CFU / ml para cada amostra do soro CP1 indicado, no ponto de tempo indicado (parte inferior do gráfico).

[018] A Figura 7 ilustra a presença de anticorpos funcionais contra sorotipos representativos de *S. pneumoniae*. Os sorotipos 6B de *S. pneumoniae* (Painel A), 16F (Painel D), 15A (Painel B) e 35B (Painel C) foram incubados separadamente em um ensaio opsonofagocítico concentrado modificado (COPA) com soros pré-imunes (P0) e imunes (P3) ativados por calor, em várias diluições, de coelhos (87, 88 e 1762) imunizados com CP1 como adjuvante de fosfato de alumínio. A presença de anticorpos funcionais é demonstrada pela morte de *S. pneumoniae*. Os resultados são expressos como atividade de morte percentual, isto é, a redução percentual em unidades formadoras de colônias de *S. pneumoniae* (CFU), após incubação com soros imunes (P3), em relação à incubação com soros pré-imunes correspondentes

(P0). Cada barra vertical dos Painéis A-D representa a porcentagem de atividade de morte observada com a diluição indicada do soro CP1 indicado (parte inferior de cada gráfico), contra o sorotipo *S. pneumoniae* indicado (parte superior de cada gráfico),

[019] A Figura 8 ilustra as respostas imunes (*por exemplo*, respostas Th17) a uma proteína de fusão CP1 exemplificativa em comparação com um polipeptídeo SP1500 ou SP0785. Os camundongos foram imunizados com polipeptídeos CP1, SP1500 ou SP0785, adjuvados com toxina da cólera ou foram imunizados com proteína Rhavi adjuvada com toxina da cólera (controle). As respostas Th17 são mostradas como concentração média geométrica de IL-17A secretada no meio após estimulação de amostras de sangue periférico de camundongos imunizados com polipeptídeo SP0785 purificado (Painel A), polipeptídeo SP1500 purificado (Painel B) ou células inteiras pneumocócicas mortas (inativadas) (WCV; Painel C). Cada ponto no gráfico representa IL-17A secretado para um camundongo. As barras horizontais representam a média geométrica de IL-17A segregada para cada grupo. CT: toxina da cólera.

[020] A Figura 9 ilustra as respostas imunes (*por exemplo*, respostas Th17) a uma proteína de fusão CP1 exemplificativa em comparação com uma proteína de fusão SP0785-ligante (SSSGG)-SP1500-ligante (SSVDKL)-PdT. Os camundongos foram imunizados com CP1 ou SP0785-ligante (SSSGG)-SP1500-ligante (SSVDKL)-PdT, adjuvada com toxina da cólera, ou foram imunizados com proteína Rhavi adjuvada com toxina da cólera (controle). As respostas Th17 são mostradas como concentração média geométrica de IL-17A secretada no meio após estimulação de amostras de sangue periférico de camundongos imunizados com polipeptídeo SP0785 purificado (Painel A) ou polipeptídeo SP1500 purificado (Painel B). Cada ponto no gráfico representa IL-17A secretado para um camundongo. As barras

horizontais representam a média geométrica de IL-17A segregada para cada grupo. CT: toxina da cólera.

[021] A Figura 10 ilustra as respostas imunes (*por exemplo*, respostas Th17) a uma proteína de fusão CP1 exemplificativa em comparação com uma mistura (não conjugada) de polipeptídeos SP0785, SP1500 e Rhavi. Os camundongos foram imunizados com CP1 ou uma mistura (não conjugada) de polipeptídeos SP0785, SP1500 e Rhavi, adjuvada com toxina da cólera, ou foram imunizados com proteína Rhavi adjuvada com toxina da cólera (controle). As respostas Th17 são mostradas como concentração média geométrica de IL-17A secretada no meio após estimulação de amostras de sangue periférico de camundongos imunizados com polipeptídeo SP0785 purificado (Painel A), polipeptídeo SP1500 purificado (Painel B) ou células inteiras pneumocócicas mortas (inativadas) (WCV; Painel C). Cada ponto no gráfico representa IL-17A secretado para um camundongo. As barras horizontais representam a média geométrica de IL-17A segregada para cada grupo. CT: toxina da cólera; mistura: mistura (não conjugada) de polipeptídeos SP0785, SP1500 e Rhavi.

[022] A Figura 11 ilustra a atividade hemolítica de uma proteína de fusão CP1 exemplificativa e proteína de fusão de SP0785-ligante (SSSGG)-SP1500-ligante (SSVDKL)-PdT (fusão PdT) contra glóbulos vermelhos de ovelha. Os glóbulos vermelhos de ovelha foram incubados com proteína de controle positivo pneumolisina (Ply), pneumolisoide PdT, CP1 ou proteína de fusão SP0785-ligante (SSSGG)-SP1500-ligante (SSVDKL)-PdT nas concentrações indicadas no eixo x. A atividade hemolítica medida por OD_{420} dos sobrenadantes é representada graficamente no eixo y.

Certas Definições

[023] No presente pedido, a menos que de outra forma claro no contexto, (i) o termo "um" pode ser entendido como significando "pelo

menos um"; (ii) o termo “ou” pode ser entendido como significando “e/ou”; (iii) os termos "compreendendo" e "incluindo" podem ser entendidos como abrangendo componentes ou etapas discriminados, apresentados por si próprios ou em conjunto com um ou mais componentes ou etapas adicionais; e (iv) os termos “cerca de” e “aproximadamente” podem ser entendidos para permitir variação padrão como seria entendido por aqueles versados na técnica; e (v) onde as faixas são fornecidas, os desfechos são incluídos.

[024] **Cerca de:** o termo "cerca de", quando usado aqui em referência a um valor, refere-se a um valor semelhante, no contexto do valor referenciado. Em geral, aqueles versados na técnica, familiarizados com o contexto, apreciarão o grau de variação relevante englobado por "cerca de" nesse contexto. Por exemplo, em algumas modalidades, o termo "cerca de" pode abranger uma faixa de valores dentro de 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% ou menos do valor referido.

[025] **Administração**: Como utilizado neste documento, o termo "administração" normalmente refere-se à administração de uma composição a um sujeito ou sistema para conseguir a distribuição de um agente que é ou está incluído na composição. Aqueles versados na técnica estarão cientes de uma variedade de vias que podem, em circunstâncias apropriadas, ser utilizadas para administração a um sujeito, por exemplo, um humano. Por exemplo, em algumas modalidades, a administração pode ser ocular, oral, parenteral, tópica, etc. Em algumas modalidades particulares, a administração pode ser brônquica (*por exemplo*, por instilação brônquica), bucal, dérmica (que pode ser ou compreender, por exemplo, um ou mais tópicos na derme, intradérmica, interdérmica, transdérmica, etc.), enteral intra-arterial, intradérmica, intragástrica, intramedular, intramuscular, intranasal, intraperitoneal, intratecal, intravenosa, intraventricular, dentro de um

órgão específico (*por exemplo*, intra-hepática), mucosa, nasal, oral, retal, subcutânea, sublingual, tópica, traqueal (*por exemplo*, por instilação intratraqueal), vaginal, vítrea, etc. Em algumas modalidades, a administração pode envolver apenas uma dose única. Em algumas modalidades, a administração pode envolver aplicar um número fixo de doses. Em algumas modalidades, a administração pode envolver a dosagem que é intermitente (*por exemplo*, uma pluralidade de doses separadas no tempo) e/ou periódica (*por exemplo*, doses individuais separadas por um período de tempo comum). Em algumas modalidades, a administração pode envolver dosagem contínua (*por exemplo*, perfusão) por pelo menos um período de tempo selecionado.

[026] **Agente**: em geral, o termo "agente", como utilizado neste documento, pode ser usado para se referir a um composto ou entidade de qualquer classe química incluindo, por exemplo, um polipeptídeo, ácido nucleico, sacarídeo, lipídeo, molécula pequena, metal ou combinação ou complexo dos mesmos. Em circunstâncias apropriadas, como ficará claro a partir do contexto para aqueles versados na técnica, o termo pode ser utilizado para se referir a uma entidade que é ou compreende uma célula ou organismo, ou uma fração, extrato ou componente do mesmo. Alternativamente ou adicionalmente, conforme o contexto deixará claro, o termo pode ser usado para se referir a um produto natural em que ele é encontrado e/ou obtido da natureza. Em alguns casos, novamente como ficará claro a partir do contexto, o termo pode ser usado para se referir a uma ou mais entidades que são feitas pelo homem no sentido de que são projetadas, engenheiradas e/ou produzidas por meio da ação da mão do homem e/ou não são encontradas na natureza. Em algumas modalidades, um agente pode ser utilizado na forma isolada ou pura; em algumas modalidades, um agente pode ser utilizado na forma bruta. Em algumas modalidades, os agentes potenciais podem ser fornecidos como coleções ou bibliotecas,

por exemplo, que podem ser rastreados para identificar ou caracterizar os agentes ativos dentro deles. Em alguns casos, o termo "agente" pode se referir a um composto ou entidade que é ou compreende um polímero; em alguns casos, o termo pode se referir a um composto ou entidade que compreende uma ou mais frações poliméricas. Em algumas modalidades, o termo "agente" pode se referir a um composto ou entidade que não é um polímero e/ou está substancialmente livre de qualquer polímero e/ou de uma ou mais frações poliméricas específicas. Em algumas modalidades, o termo pode se referir a um composto ou entidade que não possui ou está substancialmente livre de qualquer fração polimérica.

[027] **Amino ácido**: em seu sentido mais amplo, o termo "amino ácido", como utilizado neste documento, refere-se a qualquer composto e/ou substância que pode ser incorporado(a) em uma cadeia polipeptídica, *por exemplo*, através da formação de uma ou mais ligações peptídicas. Em algumas modalidades, um aminoácido possui a estrutura geral $H_2N–C(H)(R)–COOH$. Em algumas modalidades, um aminoácido é um aminoácido de ocorrência natural. Em algumas modalidades, um aminoácido é um aminoácido não natural; em algumas modalidades, um aminoácido é um D-aminoácido; em algumas modalidades, um aminoácido é um L-aminoácido. "Aminoácido padrão" refere-se a qualquer um dos vinte L-aminoácidos padrão comumente encontrados em peptídeos de ocorrência natural. "Aminoácido não padrão" refere-se a qualquer aminoácido, diferente dos aminoácidos padrão, independentemente de ser preparado sinteticamente ou obtido de uma fonte natural. Em algumas modalidades, um aminoácido, incluindo um aminoácido carbóxi e/ou amino-terminal em um polipeptídeo, pode conter uma modificação estrutural em comparação com a estrutura geral acima. Por exemplo, em algumas modalidades, um aminoácido pode ser modificado por metilação, amidação,

acetilação, peguilação, glicosilação, fosforilação e/ou substituição (*por exemplo*, do grupo amino, o grupo de ácido carboxílico, um ou mais prótons, e/ou o grupo hidroxil) em comparação com a estrutura geral. Em algumas modalidades, tal modificação pode, por exemplo, alterar a meia-vida de circulação de um polipeptídeo contendo o aminoácido modificado em comparação com um contendo um aminoácido não modificado idêntico. Em algumas modalidades, tal modificação não altera significativamente uma atividade relevante de um polipeptídeo contendo o aminoácido modificado, em comparação com um contendo um aminoácido não modificado idêntico. Como ficará claro a partir do contexto, em algumas modalidades, o termo "aminoácido" pode ser usado para se referir a um aminoácido livre; em algumas modalidades, pode ser usado para se referir a um resíduo de aminoácido de um polipeptídeo.

[028] **Anticorpo**: como utilizado neste documento, o termo "anticorpo" refere-se a um polipeptídeo que inclui elementos de sequência de imunoglobulina canônica suficientes para conferir ligação específica a um antígeno alvo particular. Como é conhecido na técnica, os anticorpos intactos produzidos na natureza são agentes tetraméricos de aproximadamente 150 kDa compostos por dois polipeptídeos de cadeia pesada idênticos (cerca de 50 kDa cada) e dois polipeptídeos de cadeia leve idênticos (cerca de 25 kDa cada) que se associam entre si em o que é comumente referido como uma estrutura em "forma de Y". Cada cadeia pesada é composta por pelo menos quatro domínios (cada um com cerca de 110 aminoácidos de comprimento) - um domínio variável do terminal amino (VH) (localizado nas pontas da estrutura Y), seguido por três domínios constantes: CH1, CH2 e o CH3 carbóxi-terminal (localizado na base da haste do Y). Uma região curta, conhecida como “desvio”, conecta as regiões variáveis e constantes da cadeia pesada. A "dobradiça" conecta os domínios CH2 e CH3 ao resto

do anticorpo. Duas ligações dissulfeto nesta região de dobradiça conectam os dois polipeptídeos da cadeia pesada um ao outro em um anticorpo intacto. Cada cadeia leve é composta por dois domínios - um domínio variável do terminal amino (VL), seguido por um domínio constante do carbóxi-terminal (CL), separado um do outro por outro "desvio". Os tetrâmeros de anticorpos intactos são compostos por dois dímeros de cadeia pesada-cadeia leve, nos quais as cadeias pesada e leve estão ligadas uma à outra por uma única ligação dissulfeto; duas outras ligações dissulfeto conectam as regiões de dobradiça da cadeia pesada uma à outra, de modo que os dímeros sejam conectados uns aos outros e o tetrâmero seja formado. Os anticorpos produzidos naturalmente também são glicosilados, tipicamente no domínio CH2. Cada domínio em um anticorpo natural possui uma estrutura caracterizada por uma "dobra de imunoglobulina" formada a partir de duas folhas beta (*por exemplo*, folhas de 3, 4 ou 5 fitas) empacotadas uma contra a outra em um barril beta antiparalelo comprimido. Cada domínio variável contém três alças hipervariáveis conhecidas como "regiões determinantes do complemento" (CDR1, CDR2 e CDR3) e quatro regiões de "estrutura" um tanto invariáveis (FR1, FR2, FR3 e FR4). Quando os anticorpos naturais se dobram, as regiões FR formam as folhas beta que fornecem a estrutura estrutural para os domínios, e as regiões doe alças CDR de ambas as cadeias pesada e leve são reunidas no espaço tridimensional de modo que criam um único sítio de ligação de antígeno hipervariável localizado na ponta da estrutura em Y. A região Fc de anticorpos de ocorrência natural liga-se a elementos do sistema complemento e também a receptores em células efetoras, incluindo, por exemplo, células efetoras que medeiam a citotoxicidade. Como é conhecido na técnica, a afinidade e/ou outros atributos de ligação das regiões Fc para os receptores Fc podem ser modulados através da glicosilação ou outra modificação. Em algumas modalidades,

os anticorpos produzidos e/ou utilizados de acordo com a presente invenção incluem domínios Fc glicosilados, incluindo domínios Fc com tal glicosilação modificada ou engenheirada. Para os fins da presente invenção, em algumas modalidades, qualquer polipeptídeo ou complexo de polipeptídeos que inclua sequências de domínio de imunoglobulina suficientes, conforme encontrado em anticorpos naturais, pode ser referido e/ou usado como um "anticorpo", se tal polipeptídeo for produzido naturalmente (*por exemplo*, gerado por um organismo reagindo a um antígeno), ou produzido por engenharia recombinante, síntese química ou outro sistema ou metodologia artificial. Em algumas modalidades, um anticorpo é policlonal; em algumas modalidades, um anticorpo é monoclonal. Em algumas modalidades, um anticorpo possui sequências de região constante que são características de anticorpos de camundongo, coelho, primata ou humanos. Em algumas modalidades, os elementos da sequência do anticorpo são humanizados, primatizados, quiméricos, etc., como é conhecido na técnica. Além disso, o termo "anticorpo", como utilizado neste documento, pode referir-se em modalidades apropriadas (a menos que indicado de outra forma ou claro do contexto) a qualquer um dos construtos ou formatos conhecidos ou desenvolvidos para a utilização de características estruturais e funcionais do anticorpo em apresentação alternativa. Por exemplo, em algumas modalidades, um anticorpo utilizado de acordo com a presente invenção está em um formato selecionado de, mas não limitado a, anticorpos IgA, IgG, IgE ou IgM intactos; anticorpos bi ou multiespecíficos (*por exemplo*, Zybodies®, etc.); fragmentos de anticorpo, tais como fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')2, fragmentos Fd', fragmentos Fd e CDRs isoladas ou conjuntos dos mesmos; Fvs de cadeia única; fusões polipeptídeo-Fc; anticorpos de domínio único (*por exemplo*, anticorpos de domínio único de tubarão, como IgNAR ou fragmentos dos mesmos);

anticorpos cameloides; anticorpos mascarados (*por exemplo*, Probodies®); Small Modular ImmunoPharmaceuticals ("SMIPs™"); diacorpos de cadeia simples ou tandem (TandAb®); VHHs; Anticalins®; minocorpos Nanobodies® ; BiTE®s; proteínas de repetição de anquirina ou DARPINs®; Avimers®; DARTs; anticorpos semelhantes a TCR; Adnectins®; Affilins®; Trans-bodies®; Affibodies®; TrimerX®; MicroProteínas; Fynomers®, Centyrins®; e KALBITOR®s. Em algumas modalidades, um anticorpo pode não ter uma modificação covalente (*por exemplo*, ligação de um glicano) que teria se fosse produzido naturalmente. Em algumas modalidades, um anticorpo pode conter uma modificação covalente (*por exemplo*, ligação de um glicano, uma carga útil [*por exemplo*, uma fração detectável, uma fração terapêutica, uma fração catalítica, etc.] ou outro grupo pendente [*por exemplo*, polietileno glicol, etc.]).

[029] **Antígeno**: o termo "antígeno", conforme usado neste documento, refere-se a (i) um agente que induz uma resposta imune; e/ou (ii) um agente que se liga a um receptor de células T (*por exemplo*, quando apresentado por uma molécula de MHC) ou a um anticorpo. Em algumas modalidades, um antígeno induz uma resposta humoral (*por exemplo*, incluindo a produção de anticorpos específicos para o antígeno); em algumas modalidades, um antígeno induz uma resposta celular (*por exemplo*, envolvendo células T cujos receptores interagem especificamente com o antígeno). Em algumas modalidades, um antígeno induz uma resposta humoral e uma resposta celular. Em algumas modalidades, um antígeno se liga a um anticorpo e pode ou não induzir uma resposta fisiológica específica em um organismo. Em geral, um antígeno pode ser ou incluir qualquer entidade química, como, por exemplo, uma pequena molécula, um ácido nucleico, um polipeptídeo, um carboidrato, um lipídeo, um polímero (em algumas modalidades que não um polímero biológico (*por exemplo*, outro do que

um ácido nucleico ou polímero de aminoácido)), etc. Em algumas modalidades, um antígeno é ou compreende um polipeptídeo. Em algumas modalidades, um antígeno é ou compreende um polissacarídeo. Aqueles versados na técnica apreciarão que, em geral, um antígeno pode ser fornecido na forma isolada ou pura ou, alternativamente, pode ser fornecido na forma bruta (*por exemplo*, juntamente com outros materiais, por exemplo, em um extrato, como um extrato ou outra preparação relativamente bruta de uma fonte contendo antígeno). Em algumas modalidades, os antígenos utilizados de acordo com a presente invenção são fornecidos em uma forma bruta. Em algumas modalidades, um antígeno é um antígeno recombinante. Em algumas modalidades, um antígeno é um polipeptídeo ou polissacarídeo que, após administração a um sujeito, induz uma resposta imune específica e/ou clinicamente relevante a tal polipeptídeo ou polissacarídeo. Em algumas modalidades, um antígeno é selecionado para induzir uma resposta imune específica e/ou clinicamente relevante a tal polipeptídeo ou polissacarídeo.

[030] **Associado a**: duas entidades estão "associadas" umas às outras, conforme esse termo é usado neste documento, se a presença, o nível e/ou a forma de um estiver correlacionado com o do outro. Em algumas modalidades, duas ou mais entidades estão fisicamente "associadas" umas às outras se interagirem, direta ou indiretamente, de modo que estejam e/ou permaneçam em proximidade física uma da outra. Em algumas modalidades, duas ou mais entidades que estão fisicamente associadas umas às outras estão covalentemente ligadas umas às outras. Em algumas modalidades, duas ou mais entidades que estão fisicamente associadas umas às outras não estão covalentemente ligadas umas às outras, mas estão associadas de forma não covalente, por exemplo, por meio de interações de afinidade, interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio, interação de van der

Waals, interações hidrofóbicas, magnetismo e combinações dos mesmos.

[031] **Ligação**: será entendido que o termo "ligação", como utilizado neste documento, normalmente refere-se a uma associação não covalente entre ou entre duas ou mais entidades. A ligação “direta” envolve o contato físico entre entidades ou metades; ligação indireta envolve interação física por meio de contato físico com uma ou mais entidades intermediárias. A ligação entre duas ou mais entidades pode ser tipicamente avaliada em qualquer um de uma variedade de contextos - incluindo onde entidades ou metades que interagem são estudadas isoladamente ou no contexto de sistemas mais complexos (*por exemplo*, enquanto covalentemente ou de outra forma associada a uma entidade portadora e/ou em um sistema biológico ou célula).

[032] **Proteína transportadora**: conforme utilizado neste documento, o termo "proteína transportadora" refere-se a uma proteína ou peptídeo que é acoplado, complexado ou de outra forma associado a um hapteno (*por exemplo*, um pequeno peptídeo ou lipídeo) ou antígeno menos imunogênico (*por exemplo,* um polissacarídeo) e que induz ou melhora uma resposta imune a tal hapteno acoplado, ou complexado, ou de outra forma associado (*por exemplo*, um pequeno peptídeo ou lipídeo) ou antígeno menos imunogênico (*por exemplo*, um polissacarídeo). Em algumas modalidades, tal resposta imune é ou compreende uma resposta a um hapteno ou antígeno menos imunogênico que é acoplado, complexado ou de outra forma associado a tal proteína transportadora. Em algumas modalidades, tal resposta imune é ou compreende uma resposta a uma proteína transportadora e um hapteno ou antígeno menos imunogênico que é acoplado, complexado ou de outra forma associado a tal proteína transportadora. Em algumas modalidades, nenhuma resposta imune significativa a uma proteína transportadora ocorre. Em algumas modalidades, a resposta

imune a uma proteína transportadora pode ser detectada; em algumas dessas modalidades, a resposta imune a essa proteína transportadora é forte. Em algumas modalidades, uma proteína transportadora é acoplada, complexada ou de outra forma associada a uma ou mais outras moléculas.

[033] **Colonização:** Conforme utilizado neste documento, o termo "colonização" geralmente refere-se à capacidade de um micróbio de crescer em um local ou superfície alvo. Por exemplo, o termo "colonização" refere-se à capacidade de um micróbio (*por exemplo*, uma bactéria) de crescer em um sítio anatômico (*por exemplo*, uma membrana mucosa, trato gastrointestinal, local de lesão, órgão, *etc*.) de um hospedeiro.

[034] **Terapia de combinação**: como utilizado neste documento, o termo "terapia de combinação" refere-se às situações em que um sujeito é exposto a dois ou mais regimes terapêuticos (*por exemplo*, dois ou mais agentes terapêuticos). Em algumas modalidades, os dois ou mais regimes podem ser administrados simultaneamente; em algumas modalidades, tais regimes podem ser administrados sequencialmente (*por exemplo*, todas as "doses" de um primeiro regime são administradas antes da administração de quaisquer doses de um segundo regime); em algumas modalidades, tais agentes são administrados em regimes de dosagem sobrepostos. Em algumas modalidades, a "administração" da terapia de combinação pode envolver administrar um ou mais agente(s) ou modalidade(s) a um sujeito que recebe o(s) outro(s) agente(s) ou modalidade(s) na combinação. Para maior clareza, a terapia de combinação não requer que os agentes individuais sejam administrados juntos em uma única composição (ou mesmo necessariamente ao mesmo tempo), embora em algumas modalidades, dois ou mais agentes, ou porções ativas dos mesmos, possam ser administrados juntos em uma composição de

combinação, ou mesmo em um composto de combinação (*por exemplo*, como parte de um único complexo químico ou entidade covalente).

[035] **Derivado**: como utilizado neste documento, o termo "derivado" ou equivalentes gramaticais dos mesmos, referem-se a um análogo estrutural de uma substância de referência. Ou seja, um “derivado” é uma substância que mostra uma similaridade estrutural significativa com a substância de referência, por exemplo, compartilhando uma estrutura principal ou de consenso, mas também difere de certas maneiras distintas. Tal substância seria considerada "derivada" da referida substância de referência. Em algumas modalidades, um derivado é uma substância que pode ser gerada a partir da substância de referência por manipulação química. Em algumas modalidades, um derivado é uma substância que pode ser gerada através da realização de um processo sintético substancialmente semelhante a (*por exemplo*, compartilhar uma pluralidade de etapas com) um que gera a substância de referência.

[036] **Domínio:** O termo "domínio", conforme utilizado neste documento, refere-se a uma seção ou porção de uma entidade. Em algumas modalidades, um "domínio" está associado a uma característica estrutural e/ou funcional particular da entidade de modo que, quando o domínio é fisicamente separado do resto de sua entidade parental, ele substancialmente ou inteiramente retém a estrutura particular e/ou recurso funcional. Alternativamente ou adicionalmente, um domínio pode ser ou incluir uma porção de uma entidade que, quando separada dessa entidade (parental) e ligada a uma entidade diferente (receptora), substancialmente retém e/ou transmite à entidade receptora um ou mais recursos estruturais e/ou funcionais que o caracterizaram na entidade parental. Em algumas modalidades, um domínio é uma seção ou porção de uma molécula (*por exemplo*, uma pequena molécula, carboidrato, lipídeo, ácido nucleico ou polipeptídeo).

Em algumas modalidades, um domínio é uma seção de um polipeptídeo; em algumas de tais modalidades, um domínio é caracterizado por um elemento estrutural particular (*por exemplo*, uma sequência de aminoácidos particular ou motivo de sequência, caráter de hélice α, caráter de folha β, caráter de bobina espiral, caráter de bobina aleatória, etc.) e/ou por uma característica funcional particular (*por exemplo*, atividade de ligação, atividade enzimática, atividade de dobra, atividade de sinalização, etc.).

[037] **Forma de dosagem ou forma de dosagem unitária**: Os versados na técnica apreciarão que o termo "forma de dosagem" pode ser usado para se referir a uma unidade fisicamente distinta de um agente ativo (*por exemplo*, um agente terapêutico ou de diagnóstico) para administração a um sujeito. Normalmente, cada uma dessas unidades contém uma quantidade predeterminada de agente ativo. Em algumas modalidades, tal quantidade é uma quantidade de dosagem unitária (ou uma fração inteira da mesma) apropriada para administração de acordo com um regime de dosagem que foi determinado para se correlacionar com um resultado desejado ou benéfico quando administrado a uma população relevante (*isto é*, com um regime de dosagem terapêutica). Aqueles ordinariamente versados na técnica apreciam que a quantidade total de uma composição terapêutica ou agente administrado a um sujeito particular é determinada por um ou mais médicos assistentes e pode envolver administrar formas de dosagem múltiplas.

[038] **Regime de dosagem:** Os versados na técnica apreciarão que o termo "regime de dosagem" pode ser usado para se referir a um conjunto de doses unitárias (tipicamente mais de uma) que são administradas individualmente a um sujeito, normalmente separadas por períodos de tempo. Em algumas modalidades, um determinado agente terapêutico possui um regime de dosagem recomendado, que

pode envolver uma ou mais doses. Em algumas modalidades, um regime de dosagem compreende uma pluralidade de doses, cada uma das quais é separada no tempo de outras doses. Em algumas modalidades, as doses individuais são separadas umas das outras por um período de tempo da mesma duração; em algumas modalidades, um regime de dosagem compreende uma pluralidade de doses e pelo menos dois períodos de tempo diferentes separando doses individuais. Em algumas modalidades, todas as doses dentro de um regime de dosagem são da mesma quantidade de dose unitária. Em algumas modalidades, diferentes doses dentro de um regime de dosagem são de diferentes quantidades. Em algumas modalidades, um regime de dosagem compreende uma primeira dose em uma primeira quantidade de dose, seguida por uma ou mais doses adicionais em uma segunda quantidade de dose diferente da primeira quantidade de dose. Em algumas modalidades, um regime de dosagem compreende uma primeira dose em uma primeira quantidade de dose, seguida por uma ou mais doses adicionais em uma segunda quantidade de dose igual à primeira quantidade de dose. Em algumas modalidades, um regime de dosagem é correlacionado com um resultado desejado ou benéfico quando administrado em uma população relevante (*isto é*, é um regime de dosagem terapêutica).

[039] **Fragmento**: um "fragmento" de um material ou entidade, conforme descrito neste documento, possui uma estrutura que inclui uma porção distinta do todo, mas carece de uma ou mais frações encontradas no todo. Em algumas modalidades, um fragmento consiste em tal porção distinta. Em algumas modalidades, um fragmento inclui uma porção distinta do todo, cuja porção distinta do todo compartilha uma ou mais características funcionais encontradas no todo. Em algumas modalidades, um fragmento consiste em tal porção distinta. Em algumas modalidades, um fragmento consiste em ou compreende um

elemento ou fração estrutural característico ou fração encontrada no todo. Em algumas modalidades, um fragmento de um polímero, *por exemplo*, um polipeptídeo ou polissacarídeo, compreende ou consiste em pelo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 ou mais unidades monoméricas (*por exemplo*, resíduos) como encontrado em todo o polímero. Em algumas modalidades, um fragmento de polímero compreende ou consiste em pelo menos cerca de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 25%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% das unidades monoméricas (*por exemplo*, resíduos) encontradas em todo o polímero. Todo o material ou entidade pode, em algumas modalidades, ser referido como o "parental" do todo.

[040] **Homologia**: Como utilizado neste documento, o termo "homologia" refere-se à relação geral entre moléculas poliméricas, *por exemplo*, entre moléculas de ácido nucleico (*por exemplo*, moléculas de DNA e/ou moléculas de RNA) e/ou entre moléculas de polipeptídeo. Em algumas modalidades, as moléculas poliméricas são consideradas "homólogas" umas às outras se suas sequências forem pelo menos 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas. Em algumas modalidades, as moléculas poliméricas são consideradas "homólogas" umas às outras se suas sequências forem pelo menos 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70 %, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% similares (*por exemplo*, contendo resíduos com propriedades químicas relacionadas nas posições correspondentes). Por exemplo, como é bem conhecido por aqueles versados na técnica, certos aminoácidos são normalmente classificados como semelhantes

entre si como aminoácidos "hidrofóbicos" ou "hidrofílicos" e/ou como possuindo cadeias laterais "polares" ou "não polares". A substituição de um aminoácido por outro do mesmo tipo pode frequentemente ser considerada uma substituição “homóloga”.

[041] **Identidade**: Como utilizado neste documento, o termo "identidade" refere-se à relação geral entre moléculas poliméricas, *por exemplo*, entre moléculas de ácido nucleico (*por exemplo*, moléculas de DNA e/ou moléculas de RNA) e/ou entre moléculas de polipeptídeo. Em algumas modalidades, as moléculas poliméricas são consideradas "substancialmente idêntica" umas às outras se suas sequências forem pelo menos 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas. O cálculo da porcentagem de identidade de duas sequências de ácido nucleico ou polipeptídeo, por exemplo, pode ser realizado alinhando as duas sequências para fins de comparação ideal (*por exemplo*, folgas podem ser introduzidas em uma ou ambas de uma primeira e uma segunda sequência para alinhamento ideal e sequências não idênticas podem ser desconsideradas para fins de comparação). Em algumas modalidades, o comprimento de uma sequência alinhada para fins de comparação é de pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, em pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, pelo menos 99,5% ou substancialmente 100% do comprimento de uma sequência de referência. Os nucleotídeos nas posições correspondentes são então comparados. Quando uma posição na primeira sequência é ocupada pelo mesmo resíduo (*por exemplo*, nucleotídeo ou aminoácido) que a posição correspondente na segunda sequência, então as moléculas são idênticas nessa posição. A identidade percentual entre as duas sequências é uma função do número de posições idênticas

compartilhadas pelas sequências, levando em consideração o número de folgas e o comprimento de cada folga, que precisa ser introduzida para o alinhamento ideal das duas sequências. A comparação de sequências e a determinação da identidade percentual entre duas sequências pode ser realizada usando um algoritmo matemático. Por exemplo, a identidade percentual entre duas sequências de nucleotídeos pode ser determinada usando o algoritmo de Meyers and Miller, 1989, que foi incorporado no programa ALIGN (versão 2.0). Em algumas modalidades exemplificativas, as comparações de sequência de ácido nucleico feitas com o programa ALIGN usam uma tabela de resíduos de peso PAM120, uma penalidade de comprimento de folga de 12 e uma penalidade de folga de 4. A identidade percentual entre duas sequências de nucleotídeos pode, alternativamente, ser determinada, usando o programa GAP no pacote de software GCG usando uma matriz NWSgapdna.CMP.

[042] **Melhorar, aumentar, inibir** ou **reduzir:** conforme utilizado neste documento, os termos "melhorar", "aumentar", "inibir", "reduzir" ou equivalentes gramaticais indicam valores que são relativos a uma linha de base ou outra medição de referência. Em algumas modalidades, uma medição de referência apropriada pode ser ou compreender uma medição em um sistema particular (*por exemplo*, em um único sujeito) sob outras condições comparáveis na presença de (*por exemplo*, antes e/ou após) um agente ou tratamento específico, ou na presença de um agente de referência comparável apropriado. Em algumas modalidades, uma medição de referência apropriada pode ser ou compreender uma medição em sistema comparável conhecido ou esperado para responder de uma maneira particular, na presença do agente ou tratamento relevante.

[043] **Quantidade imunologicamente eficaz** ou **dose imunologicamente eficaz:** Como utilizado neste documento,

"quantidade imunologicamente eficaz" ou "dose imunologicamente eficaz" refere-se a uma quantidade de uma substância antigênica ou imunogênica, *por exemplo*, um antígeno, imunogênio, complexo imunogênico, composição imunogênica, vacina ou composição farmacêutica que, quando administrada a um sujeito, em uma dose única ou como parte de uma série de doses, é suficiente para intensificar a própria resposta imune de um sujeito contra uma exposição subsequente a um patógeno. Em algumas modalidades, o patógeno é *S. pneumoniae*. Em algumas modalidades, a resposta imune é contra um ou mais sorotipos diferentes de *S. pneumoniae*. Em algumas modalidades, a resposta imune é contra dois ou mais sorotipos diferentes de *S. pneumoniae*. Em algumas modalidades, a resposta imune é contra nove ou mais sorotipos diferentes de *S. pneumoniae*. Em algumas modalidades, a resposta imune é contra treze ou mais sorotipos diferentes de *S. pneumoniae*. Em algumas modalidades, a resposta imune é contra quinze ou mais sorotipos diferentes de *S. pneumoniae*. Em algumas modalidades, a resposta imune é contra vinte e três ou mais sorotipos diferentes de *S. pneumoniae*. Em algumas modalidades, a resposta imune é contra vinte quatro ou mais sorotipos diferentes de *S. pneumoniae*. Uma quantidade imunologicamente eficaz pode variar com base no sujeito a ser tratado, a espécie do sujeito, o grau de resposta imune desejada para induzir, etc. Em algumas modalidades, uma quantidade imunologicamente eficaz é suficiente para o tratamento ou proteção de um sujeito com ou em risco de ter doença. Em algumas modalidades, uma quantidade imunologicamente eficaz refere-se a uma quantidade não tóxica, mas suficiente que pode ser uma quantidade para tratar, atenuar ou prevenir infecção e/ou doença (*por exemplo*, infecção bacteriana, infecção pneumocócica, colonização bacteriana, colonização pneumocócica, complicações associada a infecção bacteriana, complicações associadas à infecção

pneumocócica, etc.) em qualquer sujeito. Em algumas modalidades, uma quantidade imunologicamente eficaz é suficiente para induzir uma resposta imunoprotetora após a administração a um sujeito.

[044] **Resposta imunoprotetora** ou **resposta protetora:** Como utilizado neste documento, “resposta imunoprotetora” ou “resposta protetora” refere-se a uma resposta imune que medeia antígeno ou memória imunológica induzida por imunógeno. Em algumas modalidades, uma resposta imunoprotetora é induzida pela administração de uma substância, *por exemplo*, um antígeno, imunógeno, complexo imunogênico, composição imunogênica, vacina ou composição farmacêutica a um sujeito. Em algumas modalidades, a imunoproteção envolve um ou mais de vigilância imunológica ativa, uma resposta mais rápida e eficaz após a ativação imune em comparação com uma resposta observada em um sujeito virgem, eliminação eficiente do agente de ativação ou patógeno, seguido por rápida resolução da inflamação. Em algumas modalidades, uma resposta imunoprotetora é uma resposta imune adaptativa. Em algumas modalidades, uma resposta imunoprotetora é suficiente para proteger um sujeito imunizado da infecção produtiva por um patógeno ou patógenos específicos aos quais a vacina é direcionada (*por exemplo*, infecção por *S. pneumoniae*).

[045] **Imunização:** Como utilizado neste documento, "imunização", ou equivalentes gramaticais dos mesmos, refere-se a um processo de indução de uma resposta imune a um organismo ou agente infeccioso em um sujeito ("imunização ativa") ou, alternativamente, fornecer componentes do sistema imunológico contra um agente ou organismo infeccioso a um sujeito (“imunização passiva”). Em algumas modalidades, a imunização envolve administrar um ou mais antígenos, imunógenos, complexos imunogênicos, vacinas, moléculas imunes, como anticorpos, soros imunes, células imunes, como células T ou

células B, ou composições farmacêuticas a um sujeito. Em algumas modalidades, a imunização é realizada pela administração de uma quantidade imunologicamente eficaz de uma substância, *por exemplo*, um antígeno, imunógeno, complexo imunogênico, composição imunogênica, vacina, molécula imune, como um anticorpo, soro imune, célula imune, como uma célula T ou célula B, ou composição farmacêutica para um sujeito. Em algumas modalidades, a imunização resulta em uma resposta imunoprotetora no sujeito. Em algumas modalidades, a imunização ativa é realizada pela administração a um sujeito de uma substância antigênica ou imunogênica, *por exemplo*, um antígeno, imunógeno, complexo imunogênico, vacina ou composição farmacêutica. Em algumas modalidades, a imunização passiva é realizada pela administração a um sujeito de um componente do sistema imune, *por exemplo*, uma molécula imune, como um anticorpo, soro imune ou célula imune, como uma célula T ou célula B.

[046] **Isolado:** Como utilizado neste documento, o termo "isolado", ou equivalentes gramaticais dos mesmos, refere-se a uma substância e/ou entidade que foi (1) separada de pelo menos alguns dos componentes com os quais estava associada quando inicialmente produzida (seja em natureza e/ou em um ambiente experimental), e/ou (2) projetada, produzida, preparada e/ou fabricada pela mão do homem. Substâncias e/ou entidades isoladas podem ser separadas em cerca de 10%, cerca de 20%, cerca de 30%, cerca de 40%, cerca de 50%, cerca de 60%, cerca de 70%, cerca de 80%, cerca de 90%, cerca de 91%, cerca de 92%, cerca de 93%, cerca de 94%, cerca de 95%, cerca de 96%, cerca de 97%, cerca de 98%, cerca de 99% ou mais de cerca de 99% dos outros componentes com os quais foram inicialmente associados. Em algumas modalidades, os agentes isolados são cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de 91%, cerca de 92%, cerca de 93%, cerca de 94%, cerca de 95%, cerca de 96%, cerca de

97%, cerca de 98%, cerca de 99%, ou mais do que cerca de 99% puros. Conforme utilizado neste documento, uma substância é "pura" se for substancialmente livre de outros componentes. Em algumas modalidades, como será entendido por aqueles versados na técnica, uma substância pode ainda ser considerada "isolada" ou mesmo "pura", após ter sido combinada com certos outros componentes, como, por exemplo, um ou mais transportadores ou excipientes (*por exemplo*, tampão, solvente, água, etc.); em tais modalidades, a porcentagem de isolamento ou pureza da substância é calculada sem incluir tais transportadores ou excipientes. Para dar apenas um exemplo, em algumas modalidades, um polímero biológico, como um polipeptídeo ou polissacarídeo que ocorre na natureza, é considerado "isolado" quando, a) em virtude de sua origem ou fonte de derivação não está associado a alguns ou todos dos componentes que o acompanham em seu estado nativo na natureza; b) é substancialmente livre de outros polipeptídeos ou ácidos nucleicos da mesma espécie da espécie que o produz na natureza; c) é expresso por ou está de outra forma em associação com componentes de uma célula ou outro sistema de expressão que não seja da espécie que o produz na natureza. Assim, por exemplo, em algumas modalidades, um polipeptídeo ou polissacarídeo que é quimicamente sintetizado ou é sintetizado em um sistema celular diferente daquele que o produz na natureza é considerado um polipeptídeo ou polissacarídeo "isolado". Alternativamente ou adicionalmente, em algumas modalidades, um polipeptídeo ou polissacarídeo que foi submetido a uma ou mais técnicas de purificação pode ser considerado um polipeptídeo ou polissacarídeo "isolado" na medida em que foi separado de outros componentes a) com os quais está associado por natureza; e/ou b) com o qual estava associado quando inicialmente produzido.

[047] **Ligante**: conforme utilizado neste documento, o termo

"ligante" é usado para se referir a uma entidade que conecta dois ou mais elementos para formar um agente de múltiplos elementos. Por exemplo, aqueles versados na técnica apreciam que um polipeptídeo cuja estrutura inclui dois ou mais domínios funcionais ou organizacionais frequentemente inclui um trecho de aminoácidos entre tais domínios que os liga uns aos outros. Em algumas modalidades, um polipeptídeo compreendendo um elemento de ligação possui uma estrutura geral da forma geral S1-L-S2, em que S1 e S2 podem ser iguais ou diferentes e representam dois domínios associados um ao outro pelo ligante (L). Em algumas modalidades, um ligante polipeptídico possui pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 ou mais aminoácidos de comprimento. Em algumas modalidades, um ligante é caracterizado pelo fato de que tende a não adotar uma estrutura tridimensional rígida, mas em vez disso, fornece flexibilidade ao polipeptídeo. Uma variedade de diferentes elementos de ligação que podem ser usados apropriadamente quando polipeptídeos de engenharia (*por exemplo*, polipeptídeos de fusão) são conhecidos na técnica (Holliger *et al*, 1993; Poljak, 1994).

[048] **Composição farmacêutica**: como utilizado neste documento, o termo "composição farmacêutica" refere-se a uma composição na qual o agente ativo é formulado em conjunto com um ou mais transportadores farmaceuticamente aceitáveis. Em algumas modalidades, o agente ativo está presente em uma quantidade de dose unitária apropriada para administração em um regime terapêutico que mostra uma probabilidade estatisticamente significativa de atingir um efeito terapêutico predeterminado quando administrado a uma população relevante. Em algumas modalidades, uma composição farmacêutica pode ser especialmente formulada para administração na forma sólida ou líquida, incluindo aquelas adaptadas para o seguinte:

administração oral, por exemplo, poções (soluções ou suspensões aquosas ou não aquosas), comprimidos, *por exemplo*, aqueles direcionados para absorção bucal, sublingual e sistêmica, bolus, pós, grânulos, pastas para aplicação na língua; administração parenteral, por exemplo, por injeção subcutânea, intramuscular, intravenosa ou epidural como, por exemplo, uma solução ou suspensão estéril, ou formulação de liberação sustentada; aplicação tópica, por exemplo, como um creme, pomada ou um adesivo ou spray de liberação controlada aplicado à pele, pulmões ou cavidade oral; intravaginalmente ou intrarretalmente, por exemplo, como um pessário, creme ou espuma; sublingualmente; ocularmente; transdermicamente; ou nasal, pulmonar e a outras superfícies mucosas.

[049] **Farmaceuticamente aceitável**: como utilizado neste documento, o termo "farmaceuticamente aceitável" aplicado ao transportador, diluente ou excipiente usado para formular uma composição conforme divulgado neste documento significa que o transportador, diluente ou excipiente deve ser compatível com os outros ingredientes da composição e não prejudicial para o seu destinatário.

[050] **Polissacarídeo**: o termo "polissacarídeo", como utilizado neste documento, refere-se a uma molécula de carboidrato polimérico composta por longas cadeias de unidades de monossacarídeo ligadas por ligações glicosídicas, fosfodiéster ou outras ligações e, na hidrólise, fornecem os monossacarídeos ou oligossacarídeos constituintes. Os polissacarídeos variam em estrutura de linear a altamente ramificado. Os exemplos incluem polissacarídeos de armazenamento, como amido e glicogênio, polissacarídeos estruturais, como celulose e quitina e polissacarídeos microbianos e polissacarídeos antigênicos encontrados em micro-organismos, incluindo, mas não se limitando a, polissacarídeos capsulares (CPS), polissacarídeos O (OPS), polissacarídeos de núcleo O (COPS) e lipopolissacarídeos (LPS).

[051] **Polipeptídeo**: o termo "polipeptídeo", como utilizado neste documento, geralmente possui seu significado reconhecido na técnica de um polímero de pelo menos três aminoácidos, *por exemplo*, ligado um ao outro por ligações peptídicas. Aqueles versados na técnica apreciarão que o termo "polipeptídeo" se destina a ser suficientemente geral para abranger não apenas polipeptídeos com uma sequência completa aqui recitada, mas também para abranger polipeptídeos que representem fragmentos funcionais (*isto é*, fragmentos que retêm pelo menos uma atividade) de tais polipeptídeos completos. Além disso, aqueles versados na técnica entendem que as sequências de proteínas geralmente toleram alguma substituição sem destruir a atividade. Assim, qualquer polipeptídeo que retém atividade e compartilha pelo menos cerca de 30-40% de identidade de sequência geral, muitas vezes maior que cerca de 50%, 60%, 70% ou 80%, e ainda geralmente incluindo pelo menos uma região de identidade muito maior frequentemente maior que 90% ou mesmo 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% em uma ou mais regiões altamente conservadas, geralmente abrangendo pelo menos 3-4 e muitas vezes até 20 ou mais aminoácidos, com outro polipeptídeo da mesma classe, está englobado no termo relevante "polipeptídeo", conforme usado neste documento. Os polipeptídeos podem conter L-aminoácidos, D-aminoácidos ou ambos e podem conter qualquer uma de uma variedade de modificações de aminoácidos ou análogos conhecidos na técnica. Modificações úteis incluem, *por exemplo*, acetilação terminal, amidação, metilação, etc. Em algumas modalidades, as proteínas podem compreender aminoácidos naturais, aminoácidos não naturais, aminoácidos sintéticos e combinações dos mesmos.

[052] **Prevenção**: o termo "prevenir" ou "prevenção", conforme utilizado neste documento em conexão com uma doença, distúrbio e/ou condição médica, refere-se a reduzir o risco de desenvolver a doença,

distúrbio e/ou condição e/ou um atraso de início e/ou redução na frequência e/ou gravidade de uma ou mais características ou sintomas de uma doença, distúrbio ou condição específica. Em algumas modalidades, a prevenção é avaliada em uma base populacional de modo que um agente seja considerado para "prevenir" uma doença, distúrbio ou condição específica se uma diminuição estatisticamente significativa no desenvolvimento, frequência e/ou intensidade de um ou mais sintomas do doença, distúrbio ou condição é observada em uma população suscetível à doença, distúrbio ou condição. Em algumas modalidades, a prevenção pode ser considerada completa quando o início de uma doença, distúrbio ou condição foi atrasado por um período de tempo predefinido.

[053] **Proteína**: como usado neste documento, o termo "proteína" abrange um polipeptídeo. As proteínas podem incluir porções diferentes de aminoácidos (*por exemplo*, podem ser glicoproteínas, proteoglicanos, etc.) e/ou podem ser processadas ou modificadas de outra forma. Aqueles versados na técnica apreciarão que uma "proteína" pode ser uma cadeia polipeptídica completa conforme produzida por uma célula (com ou sem uma sequência de sinal), ou pode ser uma porção característica da mesma. Os versados na técnica apreciarão que uma proteína pode às vezes incluir mais de uma cadeia polipeptídica, por exemplo, ligada por uma ou mais ligações dissulfeto ou associada por outros meios. Os polipeptídeos podem conter l-aminoácidos, d-aminoácidos ou ambos e podem conter qualquer uma de uma variedade de modificações de aminoácidos ou análogos conhecidos na técnica. Modificações úteis incluem, *por exemplo*, acetilação terminal, amidação, metilação, etc. Em algumas modalidades, as proteínas podem compreender aminoácidos naturais, aminoácidos não naturais, aminoácidos sintéticos e combinações dos mesmos. O termo "peptídeo" é geralmente usado para se referir a um

polipeptídeo com um comprimento inferior a cerca de 100 aminoácidos, menos que cerca de 50 aminoácidos, menos que 20 aminoácidos ou menos que 10 aminoácidos. Em algumas modalidades, as proteínas são anticorpos, fragmentos de anticorpos, porções biologicamente ativas dos mesmos e/ou porções características dos mesmos.

[054] **Recombinante**: Como utilizado neste documento, o termo "recombinante" destina-se a referir-se a polipeptídeos que são projetados, engenheirados, preparados, expressos, criados, fabricados e/ou isolados por meios recombinantes, tais como polipeptídeos expressos usando um vetor de expressão recombinante transfectado em uma célula hospedeira; polipeptídeos isolados de uma biblioteca de polipeptídeos humanos combinatórios recombinantes; polipeptídeos isolados de um animal (*por exemplo*, um camundongo, coelho, ovelha, peixe, etc.) que é transgênico para ou de outra forma foi manipulado para expressar um gene ou genes, ou componentes do gene que codificam e/ou expressão direta do polipeptídeo ou um ou mais componente (s), porção(ões), elemento(s) ou domínio(s) dos mesmos; e/ou polipeptídeos preparados, expressos, criados ou isolados por qualquer outro meio que envolva a emenda ou ligação de elementos de sequência de ácido nucleico selecionados uns aos outros, sintetizando quimicamente elementos de sequência selecionados e/ou de outra forma gerando um ácido nucleico que codifica e/ou direciona a expressão do polipeptídeo ou um ou mais componente(s), porção(ões), elemento(s) ou domínio(s) do mesmo. Em algumas modalidades, um ou mais de tais elementos de sequência selecionados são encontrados na natureza. Em algumas modalidades, um ou mais de tais elementos de sequência selecionados são projetados in silico. Em algumas modalidades, um ou mais de tais elementos de sequência selecionados resultam de mutagênese (*por exemplo*, *in vivo* ou *in vitro*) de um elemento de sequência conhecido, *por exemplo*, de uma fonte natural

ou sintética, como, por exemplo, na linhagem germinativa de um organismo de origem de interesse (*por exemplo*, de um humano, um camundongo, etc.).

[055] **Referência**: Conforme utilizado neste documento, o termo referência descreve um padrão ou controle em relação ao qual uma comparação é realizada. Por exemplo, em algumas modalidades, um agente, animal, sujeito, população, amostra, sequência ou valor de interesse é comparado com um agente de referência ou controle, animal, sujeito, população, amostra, sequência ou valor. Em algumas modalidades, uma referência ou controle é testado e/ou determinado substancialmente de forma simultânea com o teste ou determinação de interesse. Em algumas modalidades, uma referência ou controle é uma referência ou controle histórico, opcionalmente corporificado em um meio tangível. Tipicamente, como seria entendido pelos versados na técnica, uma referência ou controle é determinado ou caracterizado em condições ou circunstâncias comparáveis àquelas sob avaliação. Os versados na técnica compreenderão quando houver semelhanças suficientes para justificar a confiança e/ou comparação com uma referência ou controle possível particular.

[056] **Resposta:** como utilizado neste documento, uma "resposta" ao tratamento pode se referir a qualquer alteração benéfica na condição de um sujeito que ocorre como resultado ou se correlaciona com o tratamento. Tal alteração pode incluir estabilização da condição (*por exemplo*, prevenção da deterioração que teria ocorrido na ausência do tratamento), melhora dos sintomas da condição e/ou melhora nas perspectivas de cura da condição, etc. Pode referir-se à resposta de um sujeito ou à resposta de um tumor. A resposta do sujeito ou tumor pode ser medida de acordo com uma ampla variedade de critérios, incluindo critérios clínicos e critérios objetivos. As técnicas para avaliar a resposta incluem, mas não estão limitadas a, exame clínico, tomografia por

emissão de pósitrons, varredura de CT de raios-X de tórax, MRI, ultrassom, endoscopia, laparoscopia, presença ou nível de biomarcadores em uma amostra obtida de um sujeito, citologia e/ou histologia. Os critérios de resposta exatos podem ser selecionados de qualquer maneira apropriada, desde que, ao comparar grupos de indivíduos e/ou tumores, os grupos a serem comparados sejam avaliados com base nos mesmos critérios ou comparáveis para determinar a taxa de resposta. Um versado na técnica será capaz de selecionar os critérios apropriados.

[057] **Risco**: Como será entendido a partir do contexto, "risco" de uma doença, distúrbio e/ou condição refere-se à probabilidade de que um determinado sujeito desenvolverá a doença, distúrbio e/ou condição. Em algumas modalidades, o risco é expresso como uma porcentagem. Em algumas modalidades, o risco é de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 até 100%. Em algumas modalidades, o risco é expresso como um risco relativo a um risco associado a uma amostra de referência ou grupo de amostras de referência. Em algumas modalidades, uma amostra de referência ou grupo de amostras de referência possui um risco conhecido de uma doença, distúrbio, condição e/ou evento. Em algumas modalidades, uma amostra de referência ou grupo de amostras de referência são de sujeitos comparáveis a um determinado sujeito. Em algumas modalidades, o risco relativo é 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais.

[058] **Sorotipo**: conforme utilizado neste documento, o termo "sorotipo", também denominado serovar, refere-se a uma variação distinta dentro de uma espécie de bactéria ou vírus ou entre células do sistema imunológico de diferentes sujeitos. Esses micro-organismos, vírus ou células são classificados juntos com base em seus antígenos de superfície celular, permitindo a classificação epidemiológica dos organismos até o nível de subespécies. Um grupo de sorovares com

antígenos comuns pode ser referido como um sorogrupo ou, às vezes, sorocomplexo.

[059] **Sujeito:** como utilizado neste documento, o termo "sujeito" refere-se a um organismo, normalmente um mamífero (*por exemplo*, um ser humano, em algumas modalidades, incluindo formas humanas pré-natais). Em algumas modalidades, um sujeito está sofrendo de uma doença, distúrbio ou condição relevante. Em algumas modalidades, um sujeito é suscetível a uma doença, distúrbio ou condição. Em algumas modalidades, um sujeito exibe um ou mais sintomas ou características de uma doença, distúrbio ou condição. Em algumas modalidades, um sujeito não exibe nenhum sintoma ou característica de uma doença, distúrbio ou condição. Em algumas modalidades, um sujeito é alguém com um ou mais aspectos característicos de suscetibilidade ou risco de uma doença, distúrbio ou condição. Em algumas modalidades, um sujeito é um paciente. Em algumas modalidades, um sujeito é um sujeito a quem o diagnóstico e/ou terapia é e/ou foi administrado.

[060] **Suscetível a**: um sujeito que é “suscetível a” uma doença, distúrbio ou condição corre o risco de desenvolver a doença, distúrbio ou condição. Em algumas modalidades, um sujeito que é suscetível a uma doença, distúrbio ou condição não exibe quaisquer sintomas da doença, distúrbio ou condição. Em algumas modalidades, um sujeito que é suscetível a uma doença, distúrbio ou condição não foi diagnosticado com a doença, distúrbio e/ou condição. Em algumas modalidades, um sujeito que é suscetível a uma doença, distúrbio ou condição é um sujeito que foi exposto a condições associadas ao desenvolvimento da doença, distúrbio ou condição. Em algumas modalidades, o risco de desenvolver uma doença, distúrbio e/ou condição é um risco baseado na população (*por exemplo*, membros da família de sujeitos que sofrem da doença, distúrbio ou condição).

[061] **Os sintomas são reduzidos**: conforme utilizado neste

documento, "os sintomas são reduzidos" quando um ou mais sintomas de uma doença, distúrbio ou condição específica são reduzidos em magnitude (*por exemplo*, intensidade, gravidade, etc.) e/ou frequência, *por exemplo*, para um nível estatístico e/ou nível clinicamente significativo ou relevante. Para fins de clareza, um atraso no início de um sintoma específico é considerado uma forma de reduzir a frequência desse sintoma.

[062] **Tratamento**: como usado neste documento, o termo "tratamento" (também "tratar" ou "tratando") refere-se a qualquer administração de uma terapia que alivia, melhora, alivia, atenua, inibe, atrasa o início, reduz a gravidade e/ou reduz a incidência de um ou mais sintomas, características e/ou causas de uma doença, distúrbio e/ou condição específica. Em algumas modalidades, tal tratamento pode ser de um sujeito que não exibe sinais da doença, distúrbio e/ou condição relevante e/ou de um sujeito que exibe apenas sinais precoces da doença, distúrbio e/ou condição. Alternativamente ou adicionalmente, tal tratamento pode ser de um sujeito que exibe um ou mais sinais estabelecidos da doença, distúrbio e/ou condição relevante. Em algumas modalidades, o tratamento pode ser de um sujeito que foi diagnosticado como sofrendo da doença, distúrbio e/ou condição relevante. Em algumas modalidades, o tratamento pode ser de um sujeito conhecido por ter um ou mais fatores de suscetibilidade que são estatisticamente correlacionados com risco aumentado de desenvolvimento da doença, distúrbio e/ou condição relevante.

[063] **Vacinação**: como utilizado neste documento, o termo "vacinação" refere-se à administração de uma composição destinada a gerar uma resposta imune, por exemplo, a um agente causador de doenças. Para os fins da presente invenção, a vacinação pode ser administrada antes, durante e/ou após a exposição a um agente causador de doenças e, em algumas modalidades, antes, durante e/ou

logo após a exposição ao agente. Em algumas modalidades, a vacinação inclui múltiplas administrações, apropriadamente espaçadas no tempo, de uma composição de vacinação. Em algumas modalidades, a vacinação inicia a imunização.

Descrição detalhada de certas modalidades

[064] A presente divulgação refere-se, geralmente, a novas proteínas de fusão imunogênicas de *S. pneumoniae* que podem ser usadas, *por exemplo*, para induzir e/ou aumentar uma resposta imunoprotetora, ou para reduzir a colonização pneumocócica em sujeitos em risco ou sofrendo de infecção pneumocócica.

[065] Duas vacinas para *S. pneumoniae* estão atualmente disponíveis nos EUA. PCV13, uma vacina conjugada 13-valente, foi aprovada para a prevenção da doença pneumocócica invasiva (IPD) causada pelos 13 sorotipos contidos na vacina em crianças e para a prevenção de pneumonia e IPD em adultos. Nesta vacina, a conjugação covalente de sacarídeos dos 13 sorotipos pneumocócicos com a proteína CRM197 cria conjugados sacarídeo-proteína, que são capazes de induzir uma resposta imune dependente de células T contra um ou mais dos 13 sorotipos pneumocócicos representados pelos sacarídeos. [PREVNAR 13 prescribing information, 2017]. Embora as infecções *por S. pneumoniae* de sorotipos multirresistentes contidos na PCV13 parecessem diminuir após a aprovação desta vacina, foi observado um aumento de infecções com sorotipos multirresistentes 35B, 23A, 23B e 15B, que são apenas alguns dos mais de 84 sorotipos de *S. pneumoniae* não incluídos na PCV13. Além disso, foi relatado que PCV13 tinha atividade marginal contra o sorotipo 3, pois sua prevalência persiste na população [Richter *et al*, 2014].

[066] A segunda vacina, PPSV23, é uma vacina polissacarídica 23-valente e é indicada para a prevenção da doença pneumocócica em adultos com mais de 50 anos de idade ou em pessoas com mais de 2

anos de idade com risco aumentado de doença pneumocócica. É composto de polissacarídeos capsulares purificados de 23 sorotipos pneumocócicos. Embora esta vacina tenha o potencial de proteger contra mais sorotipos quando comparada à PCV13, ela não fornece proteção contra os sorotipos emergentes 35B, 23A e 23B. Além disso, a PPSV23 induz uma resposta imune polissacarídica independente de células T que estimula os linfócitos B maduros, mas não os linfócitos T. Assim, esta vacina induz apenas uma resposta imune que não é duradoura nem anamnéstica após o desafio subsequente. PPSV23 não é eficaz contra a colonização. Além disso, as vacinas do tipo polissacarídeo não são usadas em bebês e crianças com menos de 2 anos de idade, porque essas crianças respondem mal aos antígenos independentes de células T [PNEUMOVAX 23 prescribing information, 2017; CDC, 2010]. Os dados sugerem que a PPSV23 pode proteger adultos e idosos contra IPD; no entanto, nenhum efeito consistente foi observado na prevenção da pneumonia [Gruber *et al*, 2008].

[067] As novas proteínas imunogênicas presentemente divulgadas representam um avanço substancial em relação às opções atualmente disponíveis para imunizar pacientes contra infecção pneumocócica. Essas proteínas imunogênicas podem ser usadas, *por exemplo*, para induzir e/ou aumentar uma resposta imunoprotetora ou para reduzir a colonização pneumocócica em sujeitos, como aqueles em risco ou sofrendo de infecção pneumocócica.

Proteínas de fusão

[068] A presente divulgação descreve novas proteínas de fusão imunogênicas de *S. pneumoniae*. Em WO2014 / 124228, os inventores demonstraram que os antígenos pneumocócicos SP0785 e SP1500 induziram individualmente uma forte resposta de recall de IL-17 em PBMCs humanas reestimuladas e esplenócitos de camundongos que foram expostos a pneumococos. A imunização de camundongos com

SP0785 mais adjuvante de toxina da cólera, ou com SP1500 mais adjuvante de toxina da cólera, resultou em redução significativa da colonização pneumocócica (na ordem de 100 vezes). A imunização com uma fusão de SP0785 com o pneumolisoide PdT, ou uma fusão de SP0785 com o pneumolisoide PdT ainda conjugado com um polissacarídeo de *Salmonella typhi*, protegeu 80% dos camundongos da sepse em um desafio letal com *S. pneumoniae*vivo. A imunização com uma fusão de SP0785, SP1500 e o pneumolisoide PdT posteriormente conjugado a um polissacarídeo de *Salmonella typhi*, também resultou em redução significativa da colonização pneumocócica (na ordem de 10 vezes).

[069] As proteínas de fusão aqui descritas e/ou utilizadas fornecem imunogenicidade melhorada e resposta de IL-17 à estimulação de proteínas, bem como redução adicional da colonização de *S. pneumoniae* e proteção contra doenças invasivas.

[070] Uma proteína de fusão inclui um, dois ou mais polipeptídeos que desencadeiam (*por exemplo*, desencadeiam principalmente) uma resposta de células T, ou que desencadeiam uma resposta de células T e B. Em algumas modalidades, a proteína de fusão compreende um ou mais dos polipeptídeos listados na Tabela 1. Em algumas modalidades, a proteína de fusão compreende dois dos polipeptídeos listados na Tabela 1. Em algumas modalidades, a proteína de fusão compreende três dos polipeptídeos listados na Tabela 1. Em algumas modalidades, a proteína de fusão compreende um ou mais polipeptídeos codificados por um ou mais dos genes listados na Tabela 1. Em algumas modalidades, a proteína de fusão compreende dois dos polipeptídeos codificados por dois ou mais dos genes listados na Tabela 1. Em algumas modalidades, a proteína de fusão compreende três polipeptídeos codificados por três dos genes listados na Tabela 1.

Tabela 1. Componentes polipeptídicos exemplificativos de

proteínas de fusão

Nome e descrição da etiqueta de locus	Proteína SEQ ID No.	DNA SEQ ID No.	Nº de Acessão NCBI
rizavidina, comprimento completo	1	9	--
rizavidina, truncada [aa 45-179] (denotado Rhavi)	2	10	n/a
SP0785, comprimento completo (cepa TIGR4)	3	11	ABJ54007.1
SP0785, truncado [aa 33-399]	4	12	n/a
SP0785, consenso completo	5	n/a	n/a
SP1500, comprimento completo (cepa TIGR4)	6	13	AAK75591.1
SP1500, truncado [aa 27-278]	7	14	n/a
SP1500, consenso completo	8	n/a	n/a

[071] Em algumas modalidades, uma proteína de fusão compreende um ou mais polipeptídeos antigênicos de *S. pneumoniae* possuindo uma sequência de aminoácidos compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 3-8 ou fragmentos antigênicos das mesmas. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão compreende dois polipeptídeos antigênicos com uma sequência de aminoácidos compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 3-8 ou fragmentos antigênicos das mesmas. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão compreende (i) dois polipeptídeos antigênicos com uma sequência de aminoácidos compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 3-8, ou fragmentos antigênicos das mesmas, e (i) uma porção de ligação à biotina compreendendo SEQ ID NO: 1 ou 2, ou fragmentos de ligação à biotina. Em algumas de tais modalidades, pelo menos um polipeptídeo antigênico é ou compreende um polipeptídeo SP0785 (*por exemplo*, SEQ ID NOs: 3-5). Em algumas de tais modalidades, pelo menos um polipeptídeo antigênico é ou compreende um polipeptídeo SP1500 (*por exemplo*, SEQ ID NOs: 6-8).

[072] Em algumas modalidades, uma proteína de fusão compreende um ou mais polipeptídeos homólogos aos polipeptídeos de

S. pneumoniae listados na Tabela 1, *por exemplo*, um polipeptídeo SP0785 ou um polipeptídeo SP1500 isolado de diferentes sorotipos de *S. pneumoniae*. Os sorotipos individuais de *S. pneumoniae* contêm numerosas mutações entre si, e algumas delas resultam em diferentes sequências de proteínas entre os diferentes sorotipos. Um versado na técnica pode facilmente substituir uma sequência de aminoácidos, ou uma porção da mesma, pela sequência de aminoácidos homóloga de um sorotipo diferente de *S. pneumoniae*. Em algumas modalidades, os polipeptídeos antigênicos têm pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 99,5% de identidade com os polipeptídeos listados na Tabela 1, ou fragmentos antigênicos dos mesmos. A variação sorotípica pode ser usada para projetar tais variantes dos polipeptídeos listados na Tabela 1.

[073] Em algumas modalidades, as proteínas de fusão aqui descritas compreendem um ou mais fragmentos de polipeptídeos listados na Tabela 1, *por exemplo*, fragmentos de ligação de biotina de rizavidina, fragmentos antigênicos de um polipeptídeo SP0785 com ou sem uma sequência de sinal, ou fragmentos antigênicos de um polipeptídeo SP1500 com ou sem uma sequência de sinal. Em algumas modalidades, as proteínas de fusão aqui descritas compreendem mutantes de truncamento que são próximos em tamanho aos polipeptídeos listados na Tabela 1. Por exemplo, podem faltar no máximo um, dois, três, quatro, cinco, dez ou vinte aminoácidos de um ou ambos os terminais (referindo-se aos polipeptídeos componentes em uma proteína de fusão). Em algumas modalidades, um fragmento é um fragmento truncado de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1-8 sem 1-5, 1-10 ou 1-20 resíduos de aminoácidos do terminal N, terminal C ou ambos, de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1-8. Em algumas modalidades, um fragmento é um fragmento truncado de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1-8 sem resíduos de aminoácidos 1-10 do terminal N,

terminal C ou ambos, de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1- 8. Por exemplo, um fragmento pode não ter 10 resíduos de aminoácidos tanto no N-terminal quanto no C-terminal de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1-8, resultando em uma proteína sem 20 resíduos de aminoácidos. Deleções internas, *por exemplo*, de 1-10, 11-20, 21-30 ou 31-40 aminoácidos, também estão contempladas.

[074] Em algumas modalidades, uma proteína de fusão compreende um polipeptídeo N-terminal e um polipeptídeo C-terminal. Em algumas modalidades, um ou ambos do polipeptídeo N-terminal e o polipeptídeo C-terminal é um polipeptídeo antigênico, por exemplo, um polipeptídeo possuindo uma sequência de aminoácidos compreendendo uma ou mais das SEQ ID NOs: 3-8, ou uma fragmento ou variante do mesmo. Em algumas modalidades, um ou ambos do polipeptídeo N-terminal e o polipeptídeo C-terminal é uma porção de ligação à biotina, por exemplo, um polipeptídeo possuindo uma sequência de aminoácidos compreendendo SEQ ID NO: 1 ou 2, ou um fragmento de ligação à biotina do mesmo. Em algumas modalidades, um do polipeptídeo N-terminal ou o polipeptídeo C-terminal é uma porção de ligação à biotina, por exemplo, um polipeptídeo possuindo uma sequência de aminoácidos compreendendo SEQ ID NO: 1 ou 2, ou um fragmento de ligação à biotina do mesmo, e o outro polipeptídeo terminal é um polipeptídeo antigênico, por exemplo, um polipeptídeo possuindo uma sequência de aminoácidos compreendendo uma ou mais das SEQ ID NOs: 3-8, ou um fragmento antigênico ou variante do mesmo.

[075] Em algumas modalidades, o polipeptídeo N-terminal e o polipeptídeo C-terminal estão diretamente ligados um ao outro. Em algumas modalidades, o polipeptídeo N-terminal e o polipeptídeo C-terminal são ligados por meio de um peptídeo ligante. O comprimento e/ou aminoácidos de um ligante, quando presente, podem ser ajustados

para obter um ligante mais flexível, semirrígido ou rígido. Ligantes peptídicos flexíveis exemplificativos são mostrados como SEQ ID NOs: 37-40. Um ligante pode geralmente ser de 1-40, como 3-10 ou 10-30 e especificamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 aminoácidos de comprimento. Em algumas modalidades, a proteína de fusão compreende um ligante. Em algumas modalidades, a proteína de fusão compreende dois ligantes. Em algumas modalidades, um ou dois ligantes são selecionados de SEQ ID NO: 37 (GGGGSSS) e SEQ ID NO: 38 (AAA). Em algumas modalidades, a proteína de fusão compreende SEQ ID NO: 37 (GGGGSSS) e SEQ ID NO: 38 (AAA). Em algumas modalidades, a proteína de fusão compreende uma sequência de aminoácidos AAA residual de um sítio de restrição Not I. Em algumas modalidades, a proteína de fusão compreende um ligante de SEQ ID NO: 37 (GGGGSSS) e uma sequência de aminoácidos AAA residual de um sítio de restrição Not I.

Proteínas de fusão exemplificativos são mostradas na Tabela 2.

Tabela 2. Proteínas de fusão exemplificativas

Nome e descrição da etiqueta de locus	**Proteína SEQ ID No.**	**DNA SEQ ID No.**
SP1500-SP0785	17	27
SP0785-SP1500	18	28
Rhavi-SP1500-SP0785	19	29
Rhavi-SP0785-SP1500	20	30
SP1500-SP0785-Rhavi	21	31
SP0785-SP1500-Rhavi	22	32
Rhavi-ligante (GGGGSSS)-SP1500-ligante (AAA)-SP0785 (também denotado CP1)	23	33
Rhavi-ligante (GGGGSSS) -SP0785-ligante (AAA)-SP1500	24	34
SP1500-ligante (GGGGSSS)-SP0785-ligante (AAA)-Rhavi	25	35
SP0785-ligante (GGGGSSS)-SP1500-ligante (AAA)-Rhavi	26	36

[076] Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece proteínas de fusão com pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou 100% de identidade de sequência com uma proteína de fusão listada na Tabela 2. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão é ou inclui uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou 100% de identidade com qualquer uma das SEQ ID NOs: 17-26. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão é ou inclui uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 23 Em algumas modalidades, uma proteína de fusão é ou inclui uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou 100% de identidade com CP1.

[077] Em algumas modalidades, uma proteína de fusão aqui descrita compreende um fragmento antigênico de uma proteína de fusão mostrada na Tabela 2. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão é ou inclui um fragmento antigênico de qualquer uma das SEQ ID NOs: 17-26. Por exemplo, pode faltar no máximo um, dois, três, quatro, cinco, dez ou vinte aminoácidos do terminal N, terminal C, ou ambos, em uma proteína de fusão de qualquer uma das SEQ ID NOs: 17-26. Em algumas modalidades, o mesmo número de resíduos é removido do terminal N e do terminal C, enquanto em outras modalidades, um número diferente de resíduos é removido do terminal N em comparação com o terminal C. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão é ou inclui um fragmento antigênico de SEQ ID NO: 23. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão é ou inclui um fragmento antigênico de CP1.

[078] Em algumas modalidades, uma proteína de fusão aqui descrita compreende uma porção de ligação à biotina. Em algumas modalidades, a proteína de fusão compreende uma porção de ligação à

biotina e um ou mais antígenos polipeptídicos. Em algumas modalidades, a proteína de fusão compreende uma porção de ligação à biotina e dois ou mais antígenos polipeptídicos. Como utilizado neste documento, uma "porção de ligação à biotina" refere-se a um polipeptídeo ou proteína de ligação à biotina, um fragmento de ligação à biotina ou um domínio de ligação à biotina do mesmo. Em algumas modalidades, a porção de ligação à biotina da proteína de fusão compreende rizavidina ou um fragmento de ligação à biotina da mesma, conforme descrito adicionalmente em WO 2012/155053, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência em sua totalidade.

[079] Em algumas modalidades, uma proteína de fusão aqui descrita compreende uma porção de ligação à biotina que é ou compreende um polipeptídeo com pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100 % de identidade com a sequência de SEQ ID NO: 1 (rizavidina) ou fragmento de ligação à biotina da mesma. Em algumas modalidades, a proteína de fusão compreende uma porção de ligação à biotina que é ou compreende um polipeptídeo com pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade com a sequência de SEQ ID NO:2 (aminoácidos 45-179 de rizavidina, denotado Rhavi), ou fragmento de ligação à biotina do mesmo. Em algumas modalidades, a proteína de fusão compreende um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade com a sequência de SEQ ID NO: 4 (aminoácidos 33-399 do polipeptídeo SP0785 de *S. pneumoniae)* ou um fragmento antigênico do mesmo. Em algumas modalidades, a proteína de fusão compreende um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade com a sequência de SEQ ID NO: 7 (aminoácidos 27-278 do polipeptídeo *S. pneumoniae* SP1500), ou um fragmento antigênico do mesmo.

[080] Em algumas modalidades, uma proteína de fusão aqui descrita compreende cada um de: (a) uma porção de ligação à biotina que é ou compreende um polipeptídeo com pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade com a sequência de SEQ ID NO: 1 (rizavidina), ou fragmento de ligação de biotina da mesma; (b) um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade com a sequência de SEQ ID NO: 4 (aminoácidos 33-399 do polipeptídeo SP0785 de *S. pneumoniae)*, ou um fragmento antigênico do mesmo; e (c) um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade com a sequência de SEQ ID NO: 7 (aminoácidos 27-278 do polipeptídeo *S. pneumoniae* SP1500) ou um fragmento antigênico do mesmo. Em algumas modalidades, a proteína de fusão compreende ainda um ou mais ligantes. Em algumas modalidades, os um ou mais ligantes são selecionados de SEQ ID NO: 37 (GGGGSSS) e SEQ ID NO: 38 (AAA). Em algumas modalidades, a proteína de fusão compreende uma sequência de aminoácidos AAA residual de um sítio de restrição Not I. Em algumas modalidades, a proteína de fusão compreende um ligante de SEQ ID NO: 37 (GGGGSSS) e uma sequência de aminoácidos AAA residual de um sítio de restrição Not I.

[081] Em algumas modalidades, uma proteína de fusão aqui descrita compreende cada um de: (a) uma porção de ligação à biotina que é ou compreende um polipeptídeo com pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade com a sequência de SEQ ID NO: 2 (aminoácidos 45-179 de rizavidina, denotado Rhavi), ou fragmento de ligação de biotina da mesma; (b) um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de

identidade com a sequência de SEQ ID NO: 4 (aminoácidos 33-399 do polipeptídeo SP0785 de *S. pneumoniae)*, ou um fragmento antigênico do mesmo; e (c) um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade com a sequência de SEQ ID NO: 5 (aminoácidos 27-278 do polipeptídeo *S. pneumoniae* SP1500) ou um fragmento antigênico do mesmo. Em algumas modalidades, a proteína de fusão compreende ainda um ou mais ligantes. Em algumas modalidades, os um ou mais ligantes são selecionados de SEQ ID NO: 37 (GGGGSSS) e SEQ ID NO: 38 (AAA). Em algumas modalidades, a proteína de fusão compreende uma sequência de aminoácidos AAA residual de um sítio de restrição Not I. Em algumas modalidades, a proteína de fusão compreende um ligante de SEQ ID NO: 37 (GGGGSSS) e uma sequência de aminoácidos AAA residual de um sítio de restrição Not I. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão aqui descrita compreende uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade com a sequência SEQ ID NO: 23. Em algumas modalidades, a proteína de fusão compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 23. Em algumas modalidades, a proteína de fusão consiste na sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 23 (CP1).

[082] Em algumas modalidades, uma proteína de fusão aqui descrita inclui uma variante ou fragmento de um polipeptídeo listado na Tabela 1. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão aqui descrita inclui um polipeptídeo codificado por uma variante ou fragmento de um gene listado na Tabela 1. Em algumas modalidades, um fragmento incluído em uma proteína de fusão aqui descrita é próximo em tamanho a um polipeptídeo de comprimento completo ou um polipeptídeo listado na Tabela 1. Por exemplo, podem faltar no máximo um, dois, três, quatro, cinco, dez, vinte ou trinta aminoácidos de um ou

ambos os terminais. Em algumas modalidades, o fragmento possui 25-50 aminoácidos de comprimento, ou 50-100, ou 100-150, ou 150-200, ou 200-250, ou 250-300, ou 300-350 aminoácidos de comprimento. Em algumas modalidades, os fragmentos resultam do processamento, ou processamento parcial, de sequências de sinal por um hospedeiro de expressão, *por exemplo*, *E. coli,* uma linhagem celular de inseto (*por exemplo*, o sistema de expressão de baculovírus) ou uma linhagem celular de mamífero (*por exemplo*, ovário de humano ou hamster chinês). Os fragmentos descritos acima ou subfragmentos dos mesmos (*por exemplo*, fragmentos de 8-50, 8-30 ou 8-20 resíduos de aminoácidos) têm preferencialmente uma das atividades biológicas descritas abaixo, como aumentar a quantidade de IL-17 liberada em pelo menos 1,5 vezes ou 2 vezes ou mais (*por exemplo*, como uma medida absoluta ou em relação a uma proteína de controle).

[083] A sequência de DNA e proteína de cada gene e polipeptídeo pode ser identificada procurando pelo a Etiqueta de Locus em um banco de dados disponível publicamente, *por exemplo*, Entrez Gene (no website de NCBI NIH na World Wide Web, em www.ncbi.nlm.nih. gov/sites/entrez?db = gene), no genoma TIGR4 de *Streptococcus pneumoniae*, e as sequências indicadas também estão incluídas no escopo da presente divulgação.

[084] Certos polipeptídeos da Tabela 1, variantes dos mesmos e polipeptídeos exemplificativos adicionais e ligantes que constituem componentes de várias modalidades das proteínas de fusão são descritos em mais detalhes abaixo.

Polipeptídeos SP0785 (por exemplo, SEQ ID NOs: 3-5) e variantes dos mesmos

[085] SP0785 é uma proteína hipotética conservada de *S. pneumoniae* descrita em WO 2014/124228. Em algumas modalidades, um polipeptídeo SP0785 é uma proteína transportadora de efluxo

conservada em cepas de *S. pneumoniae*. Em algumas modalidades, um polipeptídeo SP0785 é ou compreende um polipeptídeo SP0785 de comprimento completo. Por exemplo, em algumas modalidades, um polipeptídeo SP0785 de comprimento completo possui 399 aminoácidos (38 kDa) e é representado pela sequência de aminoácidos conforme estabelecido na SEQ ID NO: 3. Prevê-se que os aminoácidos 1-32 de SEQ ID NO: 3 sejam uma sequência de sinal e domínio transmembranar de um polipeptídeo SP0785 (aminoácidos 1-32 da proteína de comprimento completo). Em algumas modalidades, uma proteína de fusão compreende um polipeptídeo SP0785 de *S. pneumoniae*. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão compreende pelo menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 45, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 367 ou 399 aminoácidos consecutivos de um polipeptídeo SP0785.

[086] Em algumas modalidades, um polipeptídeo SP0785 da proteína de fusão compreende pelo menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 45, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 367 ou 399 aminoácidos consecutivos da sequência mostrada em SEQ ID NO: 3 [comprimento completo]. Em algumas modalidades, um polipeptídeo SP0785 da proteína de fusão compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 60% ou mais (incluindo, *por exemplo*, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95 %, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100%) idênticos a pelo menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 45, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 367 ou 399 aminoácidos consecutivos da sequência mostrada em SEQ ID NO: 3 [comprimento completo].

[087] Em algumas modalidades, um polipeptídeo SP0785 da proteína de fusão compreende pelo menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 45, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95,

100, 150, 200, 250, 300, 350 ou 367 aminoácidos consecutivos da sequência mostrada na SEQ ID NO: 4 [sequência de sinal menos e domínio transmembranar]. Em algumas modalidades, um polipeptídeo SP0785 da proteína de fusão compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 60% ou mais (incluindo, *por exemplo*, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95 %, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100%) idêntica a pelo menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19,20, 25, 30, 35, 45, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 350 ou 367 aminoácidos consecutivos da sequência mostrada em SEQ ID NO: 4 [sequência de sinal negativo e domínio transmembranar].

[088] A variação da sequência ocorre ao nível da proteína entre os diferentes sorotipos de *S. pneumoniae*, e uma sequência de consenso que ilustra combinações de sequências SP785 de diferentes sorotipos de *S. pneumoniae* é fornecida como SEQ ID NO: 5. Consequentemente, em algumas modalidades, a proteína de fusão inclui um polipeptídeo possuindo uma sequência de aminoácidos compreendendo, ou consistindo em, SEQ ID NO: 5, ou um fragmento antigênico da mesma (*por exemplo*, no lugar de um polipeptídeo possuindo uma sequência de aminoácidos compreendendo um de SEQ ID NO: 3 ou 4). Em algumas modalidades, um polipeptídeo SP0785 da proteína de fusão compreende pelo menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 45, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 350, ou 367 aminoácidos consecutivos da sequência mostrada em SEQ ID NO: 5 [consenso]. Em algumas modalidades, um polipeptídeo SP0785 da proteína de fusão compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 60% ou mais (incluindo, *por exemplo*, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95 %, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100%) idêntica a pelo menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19,20, 25, 30, 35, 45, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150,

200, 250, 300, 350 ou 367 aminoácidos consecutivos da sequência mostrada em SEQ ID NO: 5 [consensus].

[089] Uma sequência de nucleotídeos exemplificativa que codifica um polipeptídeo SP0785 é fornecida aqui como SEQ ID NO: 11.

Polipeptídeos SP1500 (por exemplo, SEQ ID NOs: 6-8) e variantes das mesmas

[090] SP1500 é descrito em WO 2014/124228. Em algumas modalidades, um polipeptídeo SP1500 é um transportador de Aminoácido ABC, polipeptídeo de ligação de aminoácido conservado em cepas de *S. pneumoniae*. Em algumas modalidades, um polipeptídeo SP1500 é ou compreende um polipeptídeo SP1500 de comprimento completo. Por exemplo, em algumas modalidades, um polipeptídeo SP1500 de comprimento completo possui 278 aminoácidos (28 kDa) e é representado pela sequência de aminoácidos conforme estabelecido na SEQ ID NO: 6. Prevê-se que os aminoácidos 1-26 de SEQ ID NO: 6 sejam uma sequência de sinal de um polipeptídeo SP1500 (aminoácidos 1-26 da proteína de comprimento completo). Em algumas modalidades, uma proteína de fusão compreende um polipeptídeo SP1500 de *S. pneumoniae*. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão compreende pelo menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 45, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 252 ou 278 aminoácidos consecutivos de um polipeptídeo SP1500.

[091] Em algumas modalidades, um polipeptídeo SP1500 da proteína de fusão compreende pelo menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 45, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 252, ou 278 aminoácidos consecutivos da sequência mostrada em SEQ ID NO: 6 [comprimento completo]. Em algumas modalidades, um polipeptídeo SP1500 da proteína de fusão compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 60% ou

mais (incluindo, *por exemplo*, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95 %, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100%) idênticos a pelo menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 45, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 252, ou 278 aminoácidos consecutivos da sequência mostrada em SEQ ID NO: 6 [comprimento completo].

[092] Em algumas modalidades, um polipeptídeo SP1500 da proteína de fusão compreende pelo menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 45, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, ou 252 aminoácidos consecutivos da sequência mostrada na SEQ ID NO: 7 [sequência de sinal menos]. Em algumas modalidades, um polipeptídeo SP1500 da proteína de fusão compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 60% ou mais (incluindo, *por exemplo*, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100%) idêntica a pelo menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19,20, 25, 30, 35, 45, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, ou 252 aminoácidos consecutivos da sequência mostrada em SEQ ID NO: 7 [sequência de sinal menos].

[093] A variação da sequência ocorre ao nível da proteína entre os diferentes sorotipos de *S. pneumoniae*, e uma sequência de consenso que ilustra combinações de sequências SP1500 de diferentes sorotipos de *S. pneumoniae* é fornecida como SEQ ID NO: 8. Em algumas modalidades, a proteína de fusão inclui um polipeptídeo possuindo uma sequência de aminoácidos compreendendo, ou consistindo em, SEQ ID NO: 8, ou um fragmento antigênico da mesma (*por exemplo*, no lugar de um polipeptídeo possuindo uma sequência de aminoácidos compreendendo um de SEQ ID NO: 6 ou 7). Em algumas modalidades, um polipeptídeo SP1500 da proteína de fusão compreende pelo menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 45, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, ou 252 aminoácidos

consecutivos da sequência mostrada na SEQ ID NO: 8 [consensus]. Em algumas modalidades, um polipeptídeo SP1500 da proteína de fusão compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 60% ou mais (incluindo, *por exemplo*, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95 %, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100%) idêntica a pelo menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19,20, 25, 30, 35, 45, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200 ou 252 aminoácidos consecutivos da sequência mostrada em SEQ ID NO: 8 [consensus].

[094] Uma sequência de nucleotídeos exemplificativa que codifica um polipeptídeo SP1500 é fornecida aqui como SEQ ID NO: 14.

Rizavidina

[095] Em algumas modalidades, uma proteína de fusão aqui descrita é um componente de complexos imunogênicos não covalentes do Sistema de Apresentação de Antígenos Múltiplos (MAPS). Em algumas modalidades, os complexos MAPS utilizam a ligação não covalente de alta afinidade (constante de dissociação [K_D] $\approx 10^{-15}$M) entre biotina, ou derivados de biotina, e rizavidina, uma proteína de ligação à biotina que não possui homologia significativa predita com proteínas humanas.

[096] Rizavidina é uma proteína dimérica de ocorrência natural na família de proteínas avidina, foi descoberta pela primeira vez em *Rhizobium etli*, uma bactéria simbiótica do feijão comum. A rizavidina possui apenas 22% de identidade de aminoácidos com a avidina de frango, uma proteína comumente encontrada em ovos, mas com alta conservação de resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação da biotina [Helppolainen *et al*, 2007]. Em algumas modalidades, a sequência de nucleotídeos da rizavidina é apresentada na SEQ ID NO: 9. Em algumas modalidades, a sequência de aminoácidos de rizavidina é apresentada na SEQ ID NO: 1. Prevê-se que os aminoácidos 1-44 da SEQ ID NO: 1 sejam sequências de sinal de rizavidina (aminoácidos 1-

44 da proteína de comprimento completo). Em algumas modalidades, uma proteína de fusão compreende rizavidina. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão compreende pelo menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 45, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, ou 179 aminoácidos consecutivos de um polipeptídeo de rizavidina.

[097] Em algumas modalidades, um polipeptídeo de rizavidina da proteína de fusão compreende pelo menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 45, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150 ou 179 aminoácidos consecutivos da sequência mostrada na SEQ ID NO: 1 [comprimento completo]. Em algumas modalidades, um polipeptídeo de rizavidina da proteína de fusão compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 60% ou mais (incluindo, *por exemplo*, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95 %, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100%) idênticos a pelo menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 45, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, ou 179 aminoácidos consecutivos da sequência mostrada em SEQ ID NO: 1 [comprimento completo].

[098] Em algumas modalidades, um polipeptídeo de rizavidina da proteína de fusão compreende pelo menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 45, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 ou 135 aminoácidos consecutivos da sequência mostrada na SEQ ID NO: 2 [sequência de sinal menos]. Em algumas modalidades, um polipeptídeo de rizavidina da proteína de fusão compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 60% ou mais (incluindo, *por exemplo*, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100%) idêntica a pelo menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19,20, 25, 30, 35, 45, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 ou 135 aminoácidos consecutivos da sequência mostrada em SEQ ID NO: 2 [sequência de sinal menos].

[099] Em algumas modalidades, um polipeptídeo de rizavidina da proteína de fusão é ou compreende os aminoácidos 50-179 da SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, um polipeptídeo de rizavidina da proteína de fusão é ou compreende os aminoácidos 55-179 da SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, um polipeptídeo de rizavidina da proteína de fusão é ou compreende os aminoácidos 60-179 da SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, um polipeptídeo de rizavidina da proteína de fusão é ou compreende os aminoácidos 65-179 da SEQ ID NO: 1.

[100] Em algumas modalidades, um polipeptídeo de rizavidina da proteína de fusão é ou compreende os aminoácidos 45-175 da SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, um polipeptídeo de rizavidina da proteína de fusão é ou compreende os aminoácidos 45-171 da SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, um polipeptídeo de rizavidina da proteína de fusão é ou compreende os aminoácidos 45-167 da SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, um polipeptídeo de rizavidina da proteína de fusão é ou compreende os aminoácidos 45-163 da SEQ ID NO: 1.

Ligante ou espaçador

[101] Em algumas modalidades, uma proteína de fusão compreende um ou mais ligantes. Em algumas modalidades, um ligante é ou compreende um ou mais aminoácidos. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão compreende um polipeptídeo antigênico unido a uma porção de ligação à biotina por um ligante. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão compreende um primeiro polipeptídeo antigênico, um segundo polipeptídeo antigênico, uma porção de ligação à biotina e pelo menos um ligante. Em algumas modalidades, o primeiro polipeptídeo antigênico e o segundo polipeptídeo antigênico são unidos por um ligante. Em algumas modalidades, o primeiro polipeptídeo antigênico ou o segundo

polipeptídeo antigênico são unidos à porção de ligação à biotina por um ligante. Em algumas modalidades, o primeiro polipeptídeo antigênico e o segundo polipeptídeo antigênico são unidos por um primeiro ligante; e o primeiro polipeptídeo antigênico ou o segundo polipeptídeo antigênico são unidos à porção de ligação à biotina por um segundo ligante.

[102] Em algumas modalidades, um ligante interpõe uma estrutura entre duas frações de proteína. Em algumas modalidades, a estrutura é ou compreende uma α-hélice. Em algumas modalidades, a estrutura é ou compreende uma fita β. Em algumas modalidades, a estrutura é ou compreende uma bobina / curva. Em algumas modalidades, a estrutura é ou compreende uma volta. Em algumas modalidades, um ligante diminui o impedimento estérico entre duas frações de proteína unidas pelo ligante. Em algumas modalidades, um ligante diminui as interações desfavoráveis entre duas frações de proteína unidas pelo ligante. Em algumas modalidades, um ligante compreende uma mistura de resíduos de glicina e serina. Em algumas modalidades, o ligante pode compreender adicionalmente resíduos de treonina, prolina e/ou alanina. Em algumas modalidades, um ligante é hidrofílico. Em algumas modalidades, um ligante é hidrofóbico. Em algumas modalidades, um ligante aumenta a estabilidade da proteína de fusão contendo o ligante.

[103] Em algumas modalidades, um ligante não interfere com o dobramento de um polipeptídeo antigênico ao qual está unido. Em algumas modalidades, um ligante não interfere com a antigenicidade de um polipeptídeo antigênico ao qual está unido. Em algumas modalidades, um ligante não reduz a antigenicidade de um polipeptídeo antigênico ao qual está unido. Em algumas modalidades, um ligante não elimina a antigenicidade de um polipeptídeo antigênico ao qual está unido. Em algumas modalidades, o efeito do ligante é determinado comparando o polipeptídeo com o polipeptídeo unido ao ligante.

[104] Em algumas modalidades, um ligante não interfere com o dobramento de uma porção de ligação à biotina ao qual está unido. Em algumas modalidades, um ligante não interfere com a capacidade de ligação à biotina de uma porção de ligação à biotina à qual está unido. Em algumas modalidades, um ligante não reduz a capacidade de ligação da biotina de uma porção de ligação à biotina ao qual está unido. Em algumas modalidades, um ligante não elimina a capacidade de ligação à biotina de uma porção de ligação à biotina à qual está unido. Em algumas modalidades, o efeito do ligante é determinado comparando a porção de ligação à biotina com a porção de ligação à biotina unida ao ligante.

[105] Em algumas modalidades, um ligante não é antigênico. Em algumas modalidades, um ligante não elicia uma resposta de células T. Em algumas modalidades, um ligante não elicita uma resposta de células B. Em algumas modalidades, um ligante não induz uma resposta de células T ou células B.

[106] Em algumas modalidades, um ligante compreende dois ou mais aminoácidos. Em algumas modalidades, um ligante pode ser 3-100, 5-100, 10-100, 20-100 30-100, 40-100, 50-100, 60-100, 70-100, 80-100, 90-100, 5-55, 10-50, 10-45, 10-40, 10-35, 10-30, 10-25, 10-20, 10-15, 3-10, 3-9, 3-8, 3 -7, 3-6, 3-5, 3-4 ou 2-3 aminoácidos de comprimento. Em algumas modalidades, um ligante compreende entre 10-100, 10-90, 10-80, 10-70, 10-60, 10-50, 10-40, 10-30, 10-20, 10-15 aminoácidos. Em algumas modalidades, o ligante compreende pelo menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 ou 95 aminoácidos. Em algumas modalidades, um ligante é ou compreende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ou 100 aminoácidos.

[107] Em algumas modalidades, um ligante é um ligante flexível. Os ligantes flexíveis podem ser úteis para unir domínios que requerem

um certo grau de movimento ou interação e podem incluir pequenos aminoácidos não polares (*por exemplo*, Gly) ou polares (*por exemplo*, Ser ou Thr). A incorporação de Ser ou Thr também pode manter a estabilidade do ligante em soluções aquosas por meio da formação de ligações de hidrogênio com as moléculas de água e, portanto, reduzir as interações desfavoráveis entre o ligante e as frações de proteína. Em algumas modalidades, um ligante compreende pequenos aminoácidos não polares (*por exemplo*, Gly) ou polares (*por exemplo*, Ser ou Thr). Em algumas modalidades, um ligante é um ligante Gly-Ser.

[108] Em algumas modalidades, um ligante é ou compreende uma sequência de aminoácidos de GGGGSSS (SEQ ID NO: 37). Em algumas modalidades, um ligante é ou compreende uma sequência de $(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO: 39) onde n representa o número de unidades GGGGS de repetição e é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30 ou mais. Em algumas modalidades, um ligante polipeptídico pode ter uma sequência de aminoácidos que é ou compreende GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:41) (*isto é*, $(GGGGS)_3$) ou GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:42) (*isto é*, $(GGGGS)_6$). Em algumas modalidades, um ligante compreende um ou mais de Gly, Ser, Thr, Ala, Lys e Glu. Em algumas modalidades, um ligante é ou compreende KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO: 43). Em algumas modalidades, um ligante é ou compreende EGKSSGSGSESKST (SEQ ID NO: 44). Em algumas modalidades, um ligante é ou compreende $(Gly)_n$ (SEQ ID NO: 45) onde n representa o número de resíduos Gly repetidos e é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30 ou mais. Em algumas modalidades, um ligante é ou compreende GGG. Em algumas modalidades, um ligante é ou compreende $(Gly)_6$ (SEQ ID NO: 40). Em algumas modalidades, um ligante é ou compreende $(Gly)_8$ (SEQ ID NO: 46). Em algumas

modalidades, um ligante é ou compreende GSAGSAAGSGEF (SEQ ID NO: 47). Em algumas modalidades, um ligante é ou compreende uma sequência de aminoácidos de AAA (SEQ ID NO:38).

[109] Em algumas modalidades, um ligante é um ligante rígido. Os ligantes rígidos são úteis para manter uma distância fixa entre os domínios e manter suas funções independentes. Os ligantes rígidos também podem ser úteis quando uma separação espacial dos domínios é crítica para preservar a estabilidade ou bioatividade de um ou mais componentes na fusão. Em algumas modalidades, um ligante é ou compreende $(EAAAK)_n$ (SEQ ID NO: 48) onde n representa o número de unidades EAAAK de repetição e é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30 ou mais. Em algumas modalidades, um ligante é ou compreende $A(EAAAK)_nA$, (SEQ ID NO:49) onde n representa o número de unidades EAAAK de repetição e é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30 ou mais. Em algumas modalidades, um ligante é ou compreende A $(EAAAK)_nA$, onde n representa o número de unidades EAAAK de repetição e é 2, 3, 4 ou 5. Em algumas modalidades, um ligante é ou compreende $A(EAAAK)_4ALEA(EAAAK)_4A$ (SEQ ID NO:50). Em algumas modalidades, um ligante é ou compreende $[A(EAAAK)_nA]_m$, (SEQ ID NO:51) em que n é 2, 3 ou 4 e m é 1 ou 2. Em algumas modalidades, um ligante é ou compreende AEAAAKEAAAKA (SEQ ID NO: 52).

[110] Em algumas modalidades, um ligante é ou compreende $(X\text{-}Pro)_n$ (SEQ ID NO: 53), com X designando qualquer aminoácido, onde n representa o número de unidades X-Pro repetidas e é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30 ou mais. Em algumas modalidades, um ligante é ou compreende $(Ala\text{-}Pro)_n$ (SEQ ID NO: 54), em que n representa o número de unidades Ala-Pro repetidas e é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30 ou mais. Em algumas modalidades, um ligante é ou compreende

$(Ala\text{-}Pro)_n$, onde n representa o número de unidades Ala-Pro de repetição e é 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ou 17.

[111] Em algumas modalidades, um ligante é ou compreende $(Lys\text{-}Pro)_n$ (SEQ ID NO: 55), onde n representa o número de unidades Lys-Pro repetidas e é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30 ou mais. Em algumas modalidades, um ligante é ou compreende $(Glu\text{-}Pro)_n$ (SEQ ID NO: 56), em que n representa o número de unidades Glu-Pro repetidas e é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30 ou mais. Em algumas modalidades, um ligante é ou compreende $(Ala\text{-}Pro)_7$ (SEQ ID NO: 57).

[112] Em algumas modalidades, um ligante é ou compreende GAPGGGGGAAAAAGGGGGGAP (ligante GAG, SEQ ID NO: 58). Em algumas modalidades, um ligante é ou compreende GAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAP (ligante GAG2, SEQ ID NO: 59). Em algumas modalidades, um ligante é ou compreende GAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAP (ligante GAG3, SEQ ID NO: 60).

[113] Ligantes ou espaçadores adequados também incluem aqueles que têm uma sequência de aminoácidos de pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais homólogos ou idênticos aos ligantes exemplares acima.

[114] Ligantes adicionais adequados para uso com algumas modalidades podem ser encontrados na Publicação de Patente U.S. 2012/0232021, depositada em 2 de março de 2012, e [Chen, 2013], cujas divulgações são incorporadas neste documento por referência em sua totalidade.

Proteínas de fusão marcadas

[115] Em algumas modalidades, uma proteína de fusão aqui

descrita pode compreender uma etiqueta. Uma etiqueta pode ser N-terminal ou C-terminal. Por exemplo, as etiquetas podem ser adicionadas a um polipeptídeo (por meio de adições ou modificações na sequência de DNA codificadora) para facilitar a purificação, detecção, solubilidade ou conferir outras características desejáveis à proteína. Em algumas modalidades, uma etiqueta pode ser um peptídeo, oligopeptídeo ou polipeptídeo que pode ser usada na purificação por afinidade. Em algumas modalidades, uma etiqueta é, compreende ou é derivada de um ou mais de poli-histidina (His), Glutationa S-transferase (GST), purificação de afinidade em tandem (TAP), FLAG, myc, hemaglutinina de influenza humana (HA), maltose proteína de ligação (MBP), glicoproteína viral de estomatite vesicular (VSV-G), tiorredoxina, V5, avidina, estreptavidina, proteína carreadora de biotina carboxil (BCCP), calmodulina, Nus, etiquetas S, lipoproteína D e galactosidase. Em algumas modalidades, uma etiqueta His é ou compreende uma sequência de aminoácidos de H_n, em que n é um número inteiro entre 2 e 10. As etiquetas His exemplificativas incluem HHHHHH (SEQ ID NO: 15) e MSYYHHHHHH (SEQ ID NO: 16). Em outras modalidades, a proteína de fusão está livre de etiquetas, como etiquetas de purificação de proteína, e é purificada por um método que não depende de afinidade para uma etiqueta de purificação. Em algumas modalidades, a proteína de fusão compreende não mais que 1, 2, 3, 4, 5, 10 ou 20 aminoácidos adicionais em um ou ambos os terminais de um polipeptídeo da Tabela 1 ou proteína de fusão da Tabela 2.

[116] Em algumas modalidades, uma proteína de fusão aqui descrita pode conter uma sequência de translocação de membrana (MTS), para facilitar a introdução da proteína de fusão em uma célula de mamífero e a estimulação subsequente da resposta imune mediada por células. Sequências de translocação de membrana exemplificativas incluem a região hidrofóbica na sequência de sinal do fator de

crescimento de fibroblastos de Kaposi, o MTS de uma sinucleína, a terceira hélice do homeodomínio da Antnapedia, SN50, integrina 3 h-região, HIV Tat, pAntp, PR-39, abaecina, apidaecina, Bac5, Bac7, proteína CS de P. berghei, e aqueles MTSs descritos na Patente US 6.248, 558, 6.432.680 e 6.248.558.

Ácidos Nucleicos

[117] Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece ácidos nucleicos, *por exemplo*, DNA, RNA ou análogos dos mesmos, que codificam um ou mais dos polipeptídeos e/ou proteínas de fusão aqui descritos. Uma sequência de DNA subjacente para os polipeptídeos aqui descritos pode ser modificada de maneiras que não afetam a sequência do produto de proteína, e tais sequências estão incluídas na invenção. Em algumas modalidades, uma sequência de DNA pode ser otimizada por códons para melhorar a expressão em um hospedeiro, como uma linhagem celular bacteriana, *por exemplo*, *E. coli*, uma linhagem celular de inseto (*por exemplo*, usando o sistema de expressão de baculovírus) ou uma linhagem celular de mamífero (*por exemplo*, ovário de humano ou hamster chinês).

[118] Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece ácidos nucleicos, *por exemplo*, DNA, RNA ou análogos dos mesmos, que são pelo menos 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 99,5 % ou 100% idênticos a uma sequência de ácido nucleico fornecida na Tabela 1, Tabela 2, ou uma variante ou porção dos mesmos. Em algumas modalidades, o ácido nucleico possui 600-2000, 800-1800, 1000-1600, 1200-1400 nucleotídeos de comprimento. Em algumas modalidades, o ácido nucleico possui 600-1600, 800-1800, 1000-2000, 2000-3000 ou 3000-4000 nucleotídeos de comprimento. Em algumas modalidades, um ácido nucleico pode ser usado para a produção recombinante de um polipeptídeo ou proteína de fusão da Tabela 1 ou Tabela 2, ou fragmentos antigênicos dos mesmos. Em algumas

modalidades, um ácido nucleico pode ser usado como vacina.

[119] As sequências de ácido nucleico que codificam variantes de SP0785 (SEQ ID NOs: 3 e 4) são fornecidas como SEQ ID NOs: 11 e 12. As sequências de ácido nucleico que codificam variantes de SP1500 (SEQ ID NOs: 6 e 7) são fornecidas como SEQ ID NOs: 13 e 14. As sequências de ácido nucleico que codificam diferentes proteínas de fusão (SEQ ID NOs: 17-26) são fornecidas como SEQ ID NOs: 27-36. Em todos os casos, devido à degenerescência no código genético, outras sequências de DNA (incluindo múltiplas sequências otimizadas por códons) poderiam ser contempladas por aqueles versados comuns para codificar tais polipeptídeos e proteínas de fusão.

[120] Os ácidos nucleicos que codificam polipeptídeos ou proteínas de fusão da Tabela 1 ou Tabela 2, ou fragmentos dos mesmos, podem ser clonados em qualquer uma de uma variedade de vetores de expressão, sob o controle de uma variedade de elementos regulatórios, e fusões podem ser criadas com outras sequências de interesse. Os métodos de clonagem de ácidos nucleicos são rotineiros e convencionais na técnica. Para referências gerais que descrevem métodos de biologia molecular que são mencionados neste pedido, *por exemplo*, isolamento, clonagem, modificação, marcação, manipulação, sequenciamento e de outra forma tratamento ou análise de ácidos nucleicos e/ou proteínas, ver, *por exemplo*, Sambrook *et al*,1989; Ausubel *et al*,1995; Davis *et al*, 1986; Hames *et al*, 1985; Dracopoli *et al*, 2018; and Coligan *et al*, 2018.

Usos de proteínas de fusão

[121] Em algumas modalidades, uma proteína de fusão aqui descrita não possui, ou possui atividade hemolítica mínima. Por exemplo, em algumas modalidades, a atividade hemolítica de uma proteína de fusão aqui descrita pode ser estabelecida por turbidimetria (OD_{420}) após a incubação da proteína de fusão em diferentes diluições

com glóbulos vermelhos (*por exemplo*, eritrócitos de ovelha), para determinar a concentração de proteína em quais 50% dos glóbulos vermelhos são lisados. Em algumas de tais modalidades, a atividade hemolítica de uma proteína de fusão aqui descrita pode ser caracterizada por uma OD_{420} menor que 0,4 ou menor, incluindo, *por exemplo*, menor que 0,3, menor que 0,25, menor que 0,2 ou menor, para uma determinada concentração de proteína.

[122] Em algumas modalidades, os polipeptídeos de *S. pneumoniae* e as proteínas de fusão aqui descritas, e fragmentos e variantes dos mesmos, são imunogênicos. Estes polipeptídeos e proteínas de fusão podem ser imunogênicos em mamíferos, por exemplo, camundongos, ratos, porquinhos-da-índia ou humanos. Um polipeptídeo antigênico ou proteína de fusão é tipicamente aquele capaz de aumentar uma resposta imune significativa em um ensaio ou em um sujeito. A resposta imune pode ser inata, humoral, mediada por células ou mucosas (combinando elementos da imunidade inata, humoral e mediada por células). Por exemplo, um polipeptídeo antigênico ou proteína de fusão pode aumentar a quantidade de IL-17 produzida por células T. Alternativamente ou adicionalmente, um polipeptídeo antigênico ou proteína de fusão pode (i) induzir a produção de anticorpos, *por exemplo*, anticorpos neutralizantes, que se ligam ao polipeptídeo e/ou à bactéria inteira, (ii) induzir imunidade Th17, (iii) ativar a resposta de células T CD4+, por exemplo, aumentando o número de células T CD4 + e/ou aumentar a localização de células T CD4 + no local de infecção ou reinfecção, (iv) ativar a resposta de células T CD8 +, por exemplo, aumentando o número de células T CD8+ e/ou aumentando a localização de células T CD8 + no local de infecção ou reinfecção, (v) ativar a resposta CD4 + e CD8 +, (vi) ativar imunidade CD4- / CD8-, (vii) induzir imunidade Th1, (viii) induzir peptídeos antimicrobianos, (ix) ativar a imunidade inata ou qualquer combinação

dos anteriores. Em algumas modalidades, um polipeptídeo antigênico ou proteína de fusão induz a produção de uma quantidade detectável de anticorpo específico para esse antígeno.

[123] Em algumas modalidades, uma proteína de fusão aqui descrita é um antígeno ou possui propriedades antigênicas. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão aqui descrita é uma proteína transportadora ou possui propriedades transportadoras. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão aqui descrita é um antígeno e uma proteína transportadora. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão aqui descrita possui propriedades transportadoras e propriedades antigênicas.

[124] Em algumas modalidades, uma proteína de fusão aqui descrita é um antígeno de um complexo imunogênico (*por exemplo*, um complexo de Sistema de Apresentação de Antígenos Múltiplos (MAPS) conforme descrito em WO 2012/155007, cujo conteúdo total é incorporado aqui por referência para os fins indicados aqui). Em algumas modalidades, uma proteína de fusão aqui descrita é uma proteína transportadora de um complexo imunogênico. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão aqui descrita é uma proteína transportadora e um antígeno de um complexo imunogênico.

[125] Em algumas modalidades, os polipeptídeos das proteínas de fusão aqui descritas têm menos de 20%, 30%, 40%, 50%, 60% ou 70% de identidade com autoantígenos humanos e/ou bactérias comensais intestinais (*por exemplo*, certas espécies *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Bifidobacterium*, *Escherichia*, e *Lactobacillu*s). Exemplos de autoantígenos humanos incluem insulina, antígeno nuclear de proliferação celular, citocromo P450 e proteína básica de mielina.

[126] Um polipeptídeo incluído em uma proteína de fusão aqui

descrita pode compreender uma ou mais porções imunogênicas e uma ou mais porções não imunogênicas. As porções imunogênicas podem ser identificadas por vários métodos, incluindo microarranjos proteicos, técnicas ELISPOT/ELISA e/ou ensaios específicos sobre diferentes mutantes de exclusão (*por exemplo*, fragmentos) do polipeptídeo em questão. As porções imunogênicas também podem ser identificadas por algoritmos de computador. Alguns algoritmos, como o EpiMatrix (produzido pela EpiVax), usam uma abordagem de matriz computacional. Outras ferramentas computacionais para identificar epítopos antigênicos incluem PEPVAC (Promiscuous EPitope-based VACcine, hospedado por Dana Farber Cancer Institute na world wide web em immunax.dfci.harvard.edu/PEPVAC), MHCPred (que usa uma abordagem de mínimos quadrados parciais e é hospedado pelo The Jenner Institute na world wide web em www.jenner. ac.uk/MHCPred) e algoritmos de banco de dados de epítopos imunológicos na World Wide Web em tools.immuneepitope.org. Um fragmento antigênico de um polipeptídeo aqui descrito compreende pelo menos uma porção imunogênica, medida experimentalmente ou identificada por algoritmo (por exemplo, o algoritmo SYFPEITHI encontrado em www.syfpeithi.de).

[127] Os epítopos previstos representativos de SP0785 e SP1500 são apresentados na Tabela 3 e na Tabela 4, respectivamente.

Tabela 3. 20 de 353 sítios principais de ligação de MHC II preditos totais (HLA-DRB1*0101) de um polipeptídeo SP0785 exemplificativo

Alelo	#	Início	Fim	Sequência	Método usado	Classificação percentual
HLA-DRB1*01:01	1	253	267	SPAAGNNTGSKYPYT	Consenso (*CombLib.,SMM,NN*)	93,69
HLA-DRB1*01:01	1	302	316	VMDDSKNYVWIVDEQ	Consenso (comblib.,smm,nn)	91,95

Alelo	#	Início	Fim	Sequência	Método usado	Classificação percentual
HLA-DRB1*01:01	1	252	266	ASPAAGNNTGSKYPY	Consenso (comblib.,smm,nn)	90,60
HLA-DRB1*01:01	1	251	265	AASPAAGNNTGSKYP	Consenso (comblib.,smm,nn)	90,11
HLA-DRB1*01:01	1	325	339	SLGNADAENQEITSG	Consenso (comblib.,smm,nn)	89,98
HLA-DRB1*01:01	1	224	238	FTSKVYPDKKWTGKL	Consenso (comblib.,smm,nn)	89,54
HLA-DRB1*01:01	1	268	282	IDVTGEVGDLKQGFS	Consenso (comblib.,smm,nn)	89,54
HLA-DRB1*01:01	1	352	366	SSLEEGKEVKADEAT	Consenso (comblib.,smm,nn)	89,54
HLA-DRB1*01:01	1	353	367	SLEEGKEVKADEATN	Consenso (comblib.,smm,nn)	89,54
HLA-DRB1*01:01	1	267	281	TIDVTGEVGDLKQGF	Consenso (comblib.,smm,nn)	89,24
HLA-DRB1*01:01	1	255	269	AAGNNTGSKYPYTID	Consenso (comblib.,smm,nn)	89,19
HLA-DRB1*01:01	1	110	124	PQLPAPVGGEDATVQ	Consenso (comblib.,smm,nn)	89,05
HLA-DRB1*01:01	1	111	125	QLPAPVGGEDATVQS	Consenso (comblib.,smm,nn)	89,05
HLA-DRB1*01:01	1	112	126	LPAPVGGEDATVQSP	Consenso (comblib.,smm,nn)	89,05
HLA-DRB1*01:01	1	113	127	PAPVGGEDATVQSPT	Consenso (comblib.,smm,nn)	89,05
HLA-DRB1*01:01	1	114	128	APVGGEDATVQSPTP	Consenso (comblib.,smm,nn)	89,05
HLA-DRB1*01:01	1	254	268	PAAGNNTGSKYPYTI	Consenso (comblib.,smm,nn)	88,73

Alelo	#	Início	Fim	Sequência	Método usado	Classificação percentual
HLA-DRB1*01:01	1	256	270	AGNNTGSKYPYTIDV	Consenso (comblib.,smm,nn)	88,21
HLA-DRB1*01:01	1	225	239	TSKVYPDKKWTGKLS	Consenso (comblib.,smm,nn)	87,42
HLA-DRB1*01:01	1	223	237	SFTSKVYPDKKWTGK	Consenso (comblib.,smm,nn)	86,32

Tabela 4. 20 de 239 sítios principais de ligação de MHC II preditos totais (HLA-DRB1*0101) de um polipeptídeo SP1500 exemplificativo

Alelo	#	Início	Fim	Peptídeo	Método usado	Classificação percentual
HLA-DRB1*01:01	1	125	139	AQAGSSGYADFEANP	Consenso (comb.lib./smm/nn)	93,70
HLA-DRB1*01:01	1	54	68	TVNWQPIDWDLKEAE	Consenso (comb.lib./smm/nn)	90,32
HLA-DRB1*01:01	1	146	160	VANKEANQYQTFNEA	Consenso (comb.lib./smm/nn)	90,02
HLA-DRB1*01:01	1	53	67	ITVNWQPIDWDLKEA	Consenso (comb.lib./smm/nn)	89,97
HLA-DRB1*01:01	1	52	66	GITVNWQPIDWDLKE	Consenso (comb.lib./smm/nn)	89,54
HLA-DRB1*01:01	1	55	69	VNWQPIDWDLKEAEL	Consenso (comb.lib./smm/nn)	89,54
HLA-DRB1*01:01	1	228	242	KDGKFQEISQKWFGE	Consenso (comb.lib./smm/nn)	89,54
HLA-DRB1*01:01	1	229	243	DGKFQEISQKWFGED	Consenso (comb.lib./smm/nn)	89,54
HLA-DRB1*01:01	1	230	244	GKFQEISQKWFGEDV	Consenso (comb.lib./smm/nn)	89,54

Alelo	#	Início	Fim	Peptídeo	Método usado	Classificação percentual
HLA-DRB1*01:01	1	231	245	KFQEISQKWFGEDVA	Consenso (comb.lib./smm/nn)	89,54
HLA-DRB1*01:01	1	239	253	WFGEDVATKEVKEGQ	Consenso (comb.lib./smm/nn)	89,54
HLA-DRB1*01:01	1	124	138	GAQAGSSGYADFEAN	Consenso (comb.lib./smm/nn)	89,06
HLA-DRB1*01:01	1	227	241	YKDGKFQEISQKWFG	Consenso (comb.lib./smm/nn)	88,56
HLA-DRB1*01:01	1	220	234	NEAFSSLYKDGKFQE	Consenso (comb.lib./smm/nn)	87,65
HLA-DRB1*01:01	1	51	65	YGITVNWQPIDWDLK	Consenso (comb.lib./smm/nn)	85,94
HLA-DRB1*01:01	1	78	92	WNGYSATDERREKVA	Consenso (comb.lib./smm/nn)	85,92
HLA-DRB1*01:01	1	208	222	ARKEDTNLVKKINEA	Consenso (comb.lib./smm/nn)	85,34
HLA-DRB1*01:01	1	82	96	SATDERREKVAFSNS	Consenso (comb.lib./smm/nn)	84,78
HLA-DRB1*01:01	1	79	93	NGYSATDERREKVAF	Consenso (comb.lib./smm/nn)	84,52
HLA-DRB1*01:01	1	80	94	GYSATDERREKVAFS	Consenso (comb.lib./smm/nn)	84,52

Composições imunogênicas e vacina

[128] A presente divulgação também fornece composições imunogênicas (*por exemplo*, composições de vacina) de, ou compreendendo, uma ou mais proteínas de fusão aqui descritas. Em algumas modalidades, a composição imunogênica compreende uma ou mais proteínas de fusão com pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou 100% de identidade de sequência com uma proteína de fusão listada na Tabela 2. Em algumas modalidades, a

composição imunogênica compreende uma proteína de fusão que é ou inclui uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou 100% de identidade a qualquer uma das SEQ ID NOs: 17-26. Em algumas modalidades, a composição imunogênica compreende uma proteína de fusão que é ou inclui uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou 100% de identidade para SEQ ID NO: 23. Em algumas modalidades, a composição imunogênica compreende uma proteína de fusão que é ou inclui uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou 100% de identidade ao CP1 (*por exemplo*, conforme descrito na Figura 1).

[129] Em algumas modalidades, uma composição imunogênica também pode compreender porções de proteínas de fusão aqui descritas, por exemplo, mutantes de deleção interna, mutantes de truncamento e fragmentos. Em algumas modalidades, as porções das referidas proteínas de fusão são imunogênicas. A imunogenicidade de uma porção de uma proteína de fusão é prontamente determinada usando os mesmos ensaios que são usados para determinar a imunogenicidade da proteína de fusão de comprimento total. Em algumas modalidades, a porção da proteína de fusão possui substancialmente a mesma imunogenicidade que a proteína de fusão de comprimento total. Em algumas modalidades, a imunogenicidade não é inferior a 10%, 20%, 30%, 40% ou 50% daquela das proteínas de fusão da Tabela 2.

Composições imunogênicas e vacina de múltiplos componentes

[130] Em algumas modalidades, uma composição imunogênica aqui descrita (*por exemplo*, uma composição de vacina) inclui uma proteína de fusão aqui descrita e, adicionalmente, um ou mais, ou dois ou mais, antígenos de *S. pneumoniae* conhecidos. Em alguns casos, os antígenos de *S. pneumoniae* conhecidos são predominantemente alvos

de anticorpos. Em alguns casos, os antígenos de *S. pneumoniae* conhecidos são polissacarídeos. Em alguns casos, os antígenos de *S. pneumoniae* conhecidos protegem da colonização de *S. pneumoniae* ou de sepse induzida por *S. pneumoniae*, pneumonia, meningite, otite média, sinusite ou infecção de outros locais ou órgãos por *S. pneumoniae*.

[131] Uma classe apropriada de antígenos de *S. pneumoniae* reconhecida na técnica é a proteína A de superfície pneumocócica (PspA) e derivados de PspA. Derivados de PspA incluem segmentos ricos em prolina com o bloco não prolina (PR+NPB, também referido como PRN e adicionalmente descrito em Daniels *et al*, 2010), e construtos relacionados compreendendo todos ou um fragmento da região rica em prolina de PspA (*por exemplo*, regiões contendo uma ou mais das sequências PAPAP, PKP, PKEPEQ e PEKP e opcionalmente incluindo um bloco não prolina). Em algumas modalidades, fragmentos ou variantes de PspA compreendem segmentos ricos em prolina com o bloco não prolina e 10, 20, 30, 40 ou mais aminoácidos adicionais da sequência de PspA. Os peptídeos contendo o NPB são particularmente imunogênicos, sugerindo que o NPB pode ser um epítopo importante.

[132] Outra classe apropriada de antígeno de *S. pneumoniae* reconhecida na técnica são os pneumolisoides. Os pneumolisoides têm homologia com a proteína pneumolisina de *S. pneumoniae* (PLY ou Ply), mas apresentam toxicidade reduzida em comparação com a pneumolisina. Os pneumolisoides podem ser derivados de pneumolisina de ocorrência natural ou de engenharia. Em algumas modalidades, um pneumolisoide possui pelo menos 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade com a pneumolisina. Em algumas modalidades, o pneumolisoide demonstra menos da metade, 1/10, 1/20, 1/50, 1/100, 1/200, 1/500 ou 1/1000 da toxicidade da pneumolisina em um ensaio para um ou ambos da atividade

hemolítica para os eritrócitos quanto da inibição dos leucócitos polimorfonucleares. Ambos os ensaios são descritos em Saunders *et al*, 1989. Pneumolisoides exemplificativos incluem PdT, um mutante triplo descrito adicionalmente em Berry *et al*, 1995; Pd-A e Pd-B, adicionalmente descritos em Paton *et al*, 1991; rPd2 e rPd3, descritos posteriormente em Ferreira *et al*, 2006; Ply8, MPLY e L460D, descritos adicionalmente em, *por exemplo*, US 2009/0285846 e L. Mitchell, 2011; ou variantes dos mesmos. Em algumas modalidades, a pneumolisina possui uma mutação no centro catalítico, como no aminoácido 428 ou 433 ou sua vizinhança.

[133] Outros antígenos de *S. pneumoniae* apropriados incluem proteína A de ligação à colina (CbpA) e derivados dos mesmos (Ogunniyi *et al*, 2001); adesina A de superfície pneumocócica (PsaA); protease caseinolítica; sortase A (SrtA); adesina RrgA do pilus 1; PpmA; PrtA; PavA; LytA; Stk-PR; PcsB; RrgB e derivados dos mesmos. Derivados de CpbA incluem construções descritas em WO 2012/134975. Tais construtos podem compreender uma ou mais cópias do domínio R2, subdomínios R21 e/ou R22 de CpbA, ou variantes ativas e fragmentos dos mesmos, ou qualquer combinação dos mesmos. Tais construtos podem compreender ainda um pneumolisoide.

[134] Em algumas modalidades, uma composição imunogênica (*por exemplo*, uma composição de vacina) contém uma ou mais proteínas de fusão aqui descritas em combinação com um ou mais polipeptídeos da Tabela 1, ou fragmentos antigênicos ou variantes dos mesmos, em uma mistura. Em algumas modalidades, a mistura contém polipeptídeos de comprimento total e fragmentos resultantes do processamento ou processamento parcial de sequências de sinal por um hospedeiro de expressão, *por exemplo*, *E. coli*, uma linhagem celular de inseto (*por exemplo*, o sistema de expressão de baculovírus) ou linhagem celular de mamífero (*por exemplo*, ovário de humano ou

hamster chinês).

[135] Em algumas modalidades, uma composição imunogênica contém uma ou mais proteínas de fusão de qualquer uma das SEQ ID NOs: 17-26 na ausência de quaisquer outros antígenos. Em algumas modalidades, uma composição imunogênica contém uma proteína de fusão de SEQ ID NO: 23 na ausência de quaisquer outros antígenos. Em algumas modalidades, uma composição imunogênica contém uma ou mais proteínas de fusão de qualquer uma das SEQ ID NOs: 17-26 em combinação com uma ou mais proteínas adicionais de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1-8, na ausência de outros antígenos. Em algumas modalidades, uma composição imunogênica contém uma proteína de fusão da SEQ ID NO: 23 em combinação com uma ou mais proteínas adicionais de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1-8, na ausência de quaisquer outros antígenos.

[136] Em algumas modalidades, as proteínas de fusão aqui descritas podem ser conjugadas a polissacarídeos de *S. pneumoniae*. Em algumas modalidades, as proteínas de fusão aqui descritas podem ser complexadas de forma não covalente com polissacarídeos de *S. pneumoniae*. Os polissacarídeos de *S. pneumoniae* podem ser, por exemplo, conforme descrito na Patente US 5.623.057, Patente US 5.371.197 ou PCT / US2011 / 023526. Os complexos não covalentes podem ser, por exemplo, aqueles do Sistema de apresentação de múltiplos antígenos (MAPS), conforme descrito em PCT / US2012 / 037412, PCT / US2012 / 037541 e Zhang *et al*, 2013.

[137] Em algumas modalidades, uma proteína de fusão aqui descrita é covalentemente ligada a outra molécula. Isso pode, por exemplo, aumentar a meia-vida, solubilidade, biodisponibilidade ou imunogenicidade da proteína de fusão. As moléculas que podem ser ligadas covalentemente à proteína de fusão incluem um carboidrato, biotina, poli(etilenoglicol) (PEG), ácido polissiálico, ácido polissiálico N-

propionilado, ácidos nucleicos, polissacarídeos e PLGA. Existem muitos tipos diferentes de PEG, variando de pesos moleculares abaixo de 300 g / mol a mais de 10.000.000 g / mol. As cadeias de PEG podem ser lineares, ramificadas ou com geometria em pente ou estrela. Em algumas modalidades, a proteína de fusão é covalentemente ligada a uma porção que estimula o sistema imunológico. Um exemplo de tal fração é uma fração lipídica. Em alguns casos, as frações lipídicas são reconhecidas por um receptor semelhante a Toll (TLR), como TLR-2 ou TLR-4, e ativam o sistema imunológico inato.

[138] Em algumas modalidades, uma proteína de fusão e um ou mais componentes adicionais aqui descritos são misturados usando métodos conhecidos para formar uma composição imunogênica de múltiplos componentes. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão e um ou mais componentes adicionais aqui descritos são nanoencapsulados usando métodos conhecidos. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão e um ou mais componentes adicionais aqui descritos são moldados em nanopartículas ou micropartículas usando métodos conhecidos. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão e um ou mais componentes adicionais descritos neste documento são conjugados através de uma ligação covalente usando métodos conhecidos para formar uma composição imunogênica de múltiplos componentes. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão e um ou mais componentes adicionais aqui descritos são unidos de forma não covalente usando métodos conhecidos para formar uma composição imunogênica de múltiplos componentes. Métodos adicionais de combinação de uma proteína de fusão e um ou mais componentes adicionais são descritos em, *por exemplo*, PCT / US2012 / 37412 e PCT / US2009 / 44956.

Composições imunogênicas baseadas em ácido nucleico e vacinas

[139] A presente divulgação também fornece composições imunogênicas (*por exemplo*, composições de vacina) de, ou compreendendo, ácidos nucleicos que codificam uma ou mais proteínas de fusão aqui descritas. Em algumas modalidades, a composição imunogênica compreende ácidos nucleicos que codificam uma ou mais proteínas de fusão com pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou 100% de identidade de sequência com uma proteína de fusão listada na Tabela 2. Em algumas modalidades, a composição imunogênica compreende ácidos nucleicos que codificam uma proteína de fusão que é ou inclui uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou 100% de identidade a qualquer uma das SEQ ID NOs: 17-26. Em algumas modalidades, a composição imunogênica compreende um ácido nucleico que codifica uma proteína de fusão que é ou inclui uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 99,5% de identidade com a SEQ ID NO: 23. Em algumas modalidades, a composição imunogênica compreende um ácido nucleico que codifica uma proteína de fusão que é ou inclui uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou 100% de identidade com CP1.

[140] Em algumas modalidades, a composição imunogênica compreende um ou mais ácidos nucleicos com pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou 100% de identidade com qualquer um de SEQ ID NOs: 27-36. Em algumas modalidades, a composição imunogênica compreende um ácido nucleico com pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 33 Em todos os casos, devido à degenerescência no código genético, outras sequências de DNA (incluindo múltiplas sequências otimizadas por códons) poderiam codificar tais proteínas de fusão. Em algumas modalidades, esses

ácidos nucleicos são expressos no indivíduo imunizado, resultando na produção das proteínas de fusão de *S. pneumoniae* codificadas e as proteínas de fusão de *S. pneumoniae* assim produzidas têm um efeito imunoestimulatório ou imunoprotetor no indivíduo imunizado.

[141] Tal composição imunoestimulatória contendo ácido nucleico pode compreender, por exemplo, uma origem de replicação e/ou um promotor que conduz a expressão de um ou mais ácidos nucleicos que codificam uma ou mais proteínas de fusão de SEQ ID NOs: 27-36. Essa composição também pode compreender um vetor de plasmídeo bacteriano no qual é inserido um promotor (às vezes um promotor viral forte), um ou mais ácidos nucleicos que codificam uma ou mais proteínas de fusão de SEQ ID NOs: 17-26 e uma sequência de terminação de poliadenilação / transcrição. Em alguns casos, o ácido nucleico é DNA. Em alguns casos, o ácido nucleico é RNA.

Usos de composições imunogênicas e vacina

[142] Em algumas modalidades, uma composição imunogênica ou vacina que inclui uma ou mais proteínas de fusão aqui descritas é caracterizada por um ou mais do potencial de opsonização ou respostas imunes a uma ou mais proteínas de fusão é aumentada em relação a um nível predeterminado, conforme medido por ELISA e/ou por um ensaio de anticorpo funcional. Em algumas modalidades, um ou mais do potencial de opsonização ou resposta imune a uma ou mais proteínas de fusão é aumentada em pelo menos 30% ou mais, incluindo, por exemplo, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90% ou mais, em relação a um nível predeterminado, conforme medido por ELISA e/ou por um ensaio de anticorpo funcional. Em algumas modalidades, um ou mais do potencial de opsonização ou respostas imunes a uma ou mais proteínas de fusão é aumentado pelo menos 1 vez, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes ou 5 vezes em relação a um nível predeterminado, medido por

ELISA e/ou por um ensaio de anticorpo funcional. Em algumas modalidades, o nível predeterminado é um nível pré-imune (*por exemplo*, um nível observado quando um sujeito não está imunizado ou é imunizado na ausência de uma ou mais proteínas de fusão aqui descritas).

[143] Em algumas modalidades, uma composição imunogênica ou vacina que inclui uma ou mais proteínas de fusão aqui descritas, mediante administração a um sujeito, induz uma resposta imune contra *S. pneumoniae.* Em algumas modalidades, a composição imunogênica ou vacina, após administração a um sujeito, induz uma resposta imune contra um ou mais sorotipos de *S. pneumoniae*. Em algumas modalidades, a composição imunogênica ou vacina, após administração a um sujeito, induz uma resposta imune protetora contra um ou mais sorotipos de *S. pneumoniae*. Em algumas modalidades, a resposta imune é um anticorpo ou resposta de células B. Em algumas modalidades, a resposta imune é uma resposta de células T. Em algumas modalidades, a resposta imune é uma resposta imune inata. Em algumas modalidades, a resposta imune é uma resposta de células T CD4+, incluindo resposta Th1, Th2 ou Th17, ou uma resposta de células T CD8+, ou uma resposta de células T CD4+ e CD8+, ou uma resposta de células T CD4- / CD8- . Em algumas modalidades, a resposta imune é um anticorpo ou resposta de células B e uma resposta de células T. Em algumas modalidades, a resposta imune é um anticorpo ou resposta de células B, uma resposta de células T e uma resposta imune inata.

[144] Em algumas modalidades, uma composição imunogênica ou vacina que inclui uma ou mais proteínas de fusão aqui descritas pode ser usada para tratamento profilático e/ou terapêutico de *S. pneumoniae*. Consequentemente, a presente divulgação fornece um método para imunizar um sujeito que sofre ou é suscetível a infecção

por *S. pneumoniae*, compreendendo administrar uma quantidade imunologicamente eficaz de qualquer composição imunogênica ou vacina que inclui uma ou mais proteínas de fusão aqui descritas. O sujeito que recebe a imunização pode ser um homem ou uma mulher e pode ser um bebê, criança, adolescente ou adulto. Em algumas modalidades, o sujeito a ser tratado é um humano. Em outras modalidades, o sujeito é um animal não humano.

[145] Em algumas modalidades, após a administração a um sujeito, uma composição imunogênica ou vacina compreendendo uma proteína de fusão aqui descrita trata ou previne a infecção por *S. pneumoniae.* Em algumas modalidades, após a administração a um sujeito, a composição imunogênica ou vacina trata ou previne a Doença Pneumocócica Invasiva (IPD) devido à infecção por *S. pneumoniae.* Em algumas modalidades, após a administração a um sujeito, a composição imunogênica ou vacina trata ou previne a bacteremia devido à infecção por *S. pneumoniae.* Em algumas modalidades, após a administração a um sujeito, a composição imunogênica ou vacina trata ou previne a sepse devido à infecção por *S. pneumoniae.* Em algumas modalidades, após a administração a um sujeito, a composição imunogênica ou vacina trata ou previne danos a órgãos devido à infecção por *S. pneumoniae.* Em algumas modalidades, após a administração a um sujeito, a composição imunogênica ou vacina trata ou previne a meningite devido à infecção por *S. pneumoniae.* Em algumas modalidades, após a administração a um sujeito, a composição imunogênica ou vacina trata ou previne a pneumonia devido à infecção por *S. pneumoniae.* Em algumas modalidades, após a administração a um sujeito, a composição imunogênica ou vacina trata ou previne a otite devido à infecção por *S. pneumoniae.* Em algumas modalidades, após a administração a um sujeito, a composição imunogênica ou vacina trata ou previne a sinusite devido à infecção por *S. pneumoniae.*

[146] Em algumas modalidades, após a administração a um sujeito, uma composição imunogênica ou vacina compreendendo uma proteína de fusão aqui descrita inibe ou reduz a taxa de ocorrência de infecção por *S. pneumoniae*. Em algumas modalidades, após a administração a um sujeito, a composição imunogênica ou vacina inibe ou reduz a taxa de ocorrência de Doença Pneumocócica Invasiva (IPD) devido à infecção por *S. pneumoniae*. Em algumas modalidades, após a administração a um sujeito, a composição imunogênica ou vacina inibe ou reduz a taxa de ocorrência de bacteremia devido à infecção por *S. pneumoniae*. Em algumas modalidades, após a administração a um sujeito, a composição imunogênica ou vacina inibe ou reduz a taxa de ocorrência de sepse devido à infecção por *S. pneumoniae*. Em algumas modalidades, após a administração a um sujeito, a composição imunogênica ou vacina inibe ou reduz a taxa de ocorrência de danos aos órgãos devido à infecção por *S. pneumoniae*. Em algumas modalidades, após a administração a um sujeito, a composição imunogênica ou vacina inibe ou reduz a taxa de ocorrência de meningite devido à infecção por *S. pneumoniae*. Em algumas modalidades, após a administração a um sujeito, a composição imunogênica ou vacina inibe ou reduz a taxa de ocorrência de meningite devido à infecção por *S. pneumoniae*. Em algumas modalidades, após a administração a um sujeito, a composição imunogênica ou vacina inibe ou reduz a taxa de ocorrência de otite média devido à infecção por *S. pneumoniae*. Em algumas modalidades, após a administração a um sujeito, a composição imunogênica ou vacina inibe ou reduz a taxa de ocorrência de sinusite devido à infecção por *S. pneumoniae*.

[147] Em algumas modalidades, após a administração a um sujeito, uma composição imunogênica ou vacina compreendendo uma proteína de fusão aqui descrita reduz a gravidade da infecção por *S. pneumoniae*. Em algumas modalidades, após a administração a um

sujeito, a composição imunogênica ou vacina reduz a gravidade da Doença Pneumocócica Invasiva (IPD) devido à infecção por *S. pneumoniae*. Em algumas modalidades, após a administração a um sujeito, a composição imunogênica ou vacina reduz a gravidade de bacteremia devido à infecção por *S. pneumoniae*. Em algumas modalidades, após a administração a um sujeito, a composição imunogênica ou vacina reduz a severidade de sepse devido à infecção por *S. pneumoniae*. Em algumas modalidades, após a administração a um sujeito, a composição imunogênica ou vacina reduz a gravidade de danos aos órgãos devido à infecção por *S. pneumoniae*. Em algumas modalidades, após a administração a um sujeito, a composição imunogênica ou vacina reduz a severidade de meningite devido à infecção por *S. pneumoniae*. Em algumas modalidades, após a administração a um sujeito, a composição imunogênica ou vacina reduz a severidade de pneumonia devido à infecção por *S. pneumoniae*. Em algumas modalidades, após a administração a um sujeito, a composição imunogênica ou vacina reduz a severidade de otite média devido à infecção por *S. pneumoniae*. Em algumas modalidades, após a administração a um sujeito, a composição imunogênica ou vacina reduz a severidade de sinusite devido à infecção por *S. pneumoniae*.

[148] Em algumas modalidades, após a administração a um sujeito, uma composição imunogênica ou vacina compreendendo uma proteína de fusão aqui descrita inibe a transmissão de *S. pneumoniae* do sujeito para outro sujeito. Em algumas modalidades, após a administração a um sujeito, a composição imunogênica ou vacina inibe a colonização por *S. pneumoniae* no sujeito. Em algumas modalidades, após a administração a um sujeito, a composição imunogênica ou vacina inibe a colonização por *S. pneumoniae* na nasofaringe do sujeito.

[149] Em algumas modalidades, uma composição imunogênica ou vacina compreendendo uma proteína de fusão aqui descrita, mediante

administração a um sujeito, induz uma resposta imune contra *S. pneumoniae* no sujeito em um nível maior do que uma composição de controle. Em algumas modalidades, a composição imunogênica ou vacina, após administração a um sujeito, induz uma resposta imune contra um ou mais sorotipos de *S. pneumoniae* em um nível maior do que uma composição de controle. Em algumas modalidades, o nível maior é cerca de 1%, cerca de 2%, cerca de 3%, cerca de 4%, cerca de 5%, cerca de 6%, cerca de 7%, cerca de 8%, cerca de 9%, cerca de 10%, cerca de 11 %, cerca de 12%, cerca de 13%, cerca de 14%, cerca de 15%, cerca de 16%, cerca de 17%, cerca de 18%, cerca de 19%, cerca de 20%, cerca de 21%, cerca de 22%, cerca de 23%, cerca de 24%, cerca de 25%, cerca de 30%, cerca de 35%, cerca de 40%, cerca de 45%, cerca de 50%, cerca de 55%, cerca de 60%, cerca de 65%, cerca de 70%, cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90% ou cerca de 95% da composição de controle.

[150] Em algumas modalidades, uma composição imunogênica ou vacina compreendendo uma proteína de fusão aqui descrita, mediante administração a um sujeito, induz uma resposta imune que pode ajudar a proteger contra o estabelecimento de *S. pneumoniae* em um nível maior do que uma composição de controle. Em algumas modalidades, a composição imunogênica ou vacina protege contra a colonização em um nível maior do que uma composição de controle. Em algumas modalidades, a composição imunogênica ou vacina inibe a infecção por *S. pneumoniae* em um sujeito não colonizado ou não infectado em um nível maior do que uma composição de controle. Em algumas modalidades, a composição imunogênica ou vacina reduz a duração da colonização por *S. pneumoniae* em um sujeito que já está colonizado em um nível maior do que uma composição de controle. Em algumas modalidades, o nível maior é cerca de 1%, cerca de 2%, cerca de 3%, cerca de 4%, cerca de 5%, cerca de 6%, cerca de 7%, cerca de 8%,

cerca de 9%, cerca de 10%, cerca de 11 %, cerca de 12%, cerca de 13%, cerca de 14%, cerca de 15%, cerca de 16%, cerca de 17%, cerca de 18%, cerca de 19%, cerca de 20%, cerca de 21%, cerca de 22%, cerca de 23%, cerca de 24%, cerca de 25%, cerca de 30%, cerca de 35%, cerca de 40%, cerca de 45%, cerca de 50%, cerca de 55%, cerca de 60%, cerca de 65%, cerca de 70%, cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90% ou cerca de 95% da composição de controle.

Composições de anticorpos

[151] Algumas modalidades fornecem uma composição de anticorpo compreendendo anticorpos criados em um mamífero imunizado com uma composição imunogênica ou vacina compreendendo uma proteína de fusão aqui descrita. Em algumas modalidades, um anticorpo compreende pelo menos um anticorpo selecionado do grupo que consiste em Abs monoclonais (mAbs) e anticorpos anti-idiotipo. Em algumas modalidades, uma composição de anticorpo compreende uma fração isolada de gamaglobulina. Em algumas modalidades, uma composição de anticorpo compreende anticorpos policlonais. Em algumas modalidades, a composição de anticorpo é administrada a um sujeito.

Formulações de Vacinas

[152] Quantidades ideais de componentes para uma vacina particular compreendendo uma proteína de fusão aqui descrita podem ser verificadas por estudos padrão envolvendo a observação de respostas imunes apropriadas em sujeitos. Após uma imunização inicial, os indivíduos podem receber uma ou várias imunizações de reforço adequadamente espaçadas no tempo.

[153] A composição imunogênica ou vacina compreendendo uma proteína de fusão aqui descrita, e/ou preparações da mesma, pode ser formulada em uma forma de dosagem unitária para facilidade de

administração e uniformidade de dosagem. O nível de dose terapeuticamente eficaz específico para qualquer sujeito ou organismo particular pode depender de uma variedade de fatores incluindo a gravidade ou grau de risco de infecção; a atividade da vacina específica ou composição da vacina usada; outras características da vacina específica ou composição da vacina usada; a idade, peso corporal, saúde geral, sexo do sujeito, dieta do sujeito, condição farmacocinética do sujeito, o tempo de administração (*por exemplo*, em relação a outras atividades do sujeito, como comer, dormir, receber outros medicamentos, incluindo outras doses de vacina, etc.), via de administração, taxa de excreção da vacina específica ou composição de vacina utilizada; vacinas usadas em combinação ou coincidentes com a composição da vacina usada; e fatores semelhantes bem conhecidos nas técnicas médicas.

[154] Uma composição imunogênica ou vacina compreendendo uma proteína de fusão aqui descrita para uso de acordo com a presente divulgação pode ser formulada em composições (*por exemplo*, composições farmacêuticas) de acordo com técnicas conhecidas. A preparação da vacina é geralmente descrita em Vaccine Design (Powell and Newman, 1995). Por exemplo, uma quantidade imunologicamente de um produto de vacina pode ser formulada em conjunto com um ou mais materiais transportadores orgânicos ou inorgânicos, líquidos ou sólidos, farmaceuticamente adequados.

[155] Em geral, os transportadores farmaceuticamente aceitáveis incluem solventes, meios de dispersão e semelhantes, que são compatíveis com a administração farmacêutica. Por exemplo, os materiais que podem servir como transportadores farmaceuticamente aceitáveis incluem, mas não estão limitados a açúcares como lactose, glicose, dextrose e sacarose; amidos, como amido de milho e amido de batata; celulose e seus derivados, tais como carboximetil celulose de

sódio, etil celulose e acetato de celulose; tragacanto em pó; malte; gelatina; talco; excipientes, tais como manteiga de cacau e ceras para supositórios; óleos como óleo de amendoim, óleo de semente de algodão, óleo de cártamo, óleo de sésamo, azeite, óleo de milho e óleo de soja; polióis, tais como glicerol, propileno glicol e polietileno glicol líquido; ésteres, tais como oleato de etil e laurato de etil; ágar; agentes tamponantes, tais como hidróxido de magnésio; ácido algínico; água apirogênica; solução salina isotônica; Solução de Ringer; álcool etílico e soluções de tampão de fosfato, bem como outros lubrificantes não tóxicos compatíveis, como lauril sulfato de sódio e estearato de magnésio, bem como conservantes e antioxidantes também podem estar presentes na composição, de acordo com o julgamento do formulador (Martin, 1975).

[156] As vacinas podem ser formuladas combinando uma ou mais proteínas de fusão aqui descritas com transportadores e/ou outros componentes opcionais por qualquer meio disponível incluindo, por exemplo, mistura convencional, granulação, dissolução, liofilização ou processos semelhantes.

[157] As vacinas que compreendem uma ou mais proteínas de fusão aqui descritas podem ser liofilizadas até que estejam prestes a serem utilizadas, momento em que são extemporaneamente reconstituídas com diluente. Em algumas modalidades, os componentes ou composições da vacina são liofilizados na presença de um ou mais outros componentes (*por exemplo*, adjuvantes) e são reconstituídos extemporaneamente com solução salina. Alternativamente, os componentes individuais ou conjuntos de componentes podem ser liofilizados separadamente e/ou armazenados (*por exemplo*, em um kit de vacinação), os componentes sendo reconstituídos e misturados antes do uso ou administrados separadamente ao sujeito.

[158] A liofilização pode produzir uma composição mais estável (por exemplo, evitando ou reduzindo a degradação de antígenos polissacarídicos). A liofilização de vacinas ou componentes de vacina é bem conhecida na técnica. Normalmente, uma vacina líquida ou componente de vacina é liofilizado, frequentemente na presença de um agente anti-aglomerante (como, por exemplo, açúcares como sacarose ou lactose). Em algumas modalidades, o agente antiaglomerante está presente, por exemplo, em uma concentração inicial de 10-200 mg / ml. A liofilização normalmente ocorre ao longo de uma série de etapas, por exemplo, um ciclo começando em -69°C, ajustando gradualmente para -24°C ao longo de 3h, em seguida, mantendo esta temperatura por 18h, então ajustando gradualmente para -16°C ao longo de 1h, em seguida, mantendo essa temperatura por 6h, depois ajustando gradualmente para + 34°C ao longo de 3h e, finalmente, mantendo essa temperatura por 9h.

[159] Em algumas modalidades, uma vacina compreendendo uma proteína de fusão aqui descrita é um líquido. Em algumas modalidades, o líquido é um liofilizado reconstituído. Em algumas modalidades, uma vacina possui um pH de cerca de 5, cerca de 6, cerca de 7 ou cerca de 8. Em algumas modalidades, uma vacina possui um pH entre cerca de 5 e cerca de 7,5. Em algumas modalidades, uma vacina possui um pH entre 5 e 7,5. Em algumas modalidades, uma vacina possui um pH entre cerca de 5,3 e cerca de 6,3. Em algumas modalidades, uma vacina possui um pH entre 5,3 e 6,3. Em algumas modalidades, uma vacina possui um pH de cerca de 5,0, cerca de 5,1, cerca de 5,2, cerca de 5,3, cerca de 5,4, cerca de 5,5, cerca de 5,6, cerca de 5,7, cerca de 5,8, cerca de 5,9, cerca de 6,0, cerca de 6,1, cerca de 6,2, cerca de 6,3, cerca de 6,4, cerca de 6,5, cerca de 6,6, cerca de 6,7, cerca de 6,8, cerca de 6,9, cerca de 7,0, cerca de 7,1, cerca de 7,2, cerca de 7,3, cerca de 7,4 ou cerca de 7,5.

[160] Vacinas ou componentes de vacina para uso de acordo com a presente divulgação podem ser incorporados em lipossomas, cocleatos, polímeros biodegradáveis, tais como poli-lactida, poliglicolida e poli-lactida-co-glicolida, ou complexos imunoestimulantes (ISCOMS).

[161] Em certas situações, pode ser desejável prolongar o efeito ou liberação de uma vacina para uso de acordo com a presente invenção, por exemplo, retardando a absorção de um ou mais componentes da vacina. Esse retardo de absorção pode ser realizado, por exemplo, pelo uso de uma suspensão líquida de material cristalino ou amorfo com baixa solubilidade em água. A taxa de absorção do produto depende então de sua taxa de dissolução, que por sua vez, pode depender do tamanho e da forma. Alternativamente, ou adicionalmente, a absorção retardada pode ser realizada dissolvendo ou suspendendo um ou mais componentes da vacina em um veículo oleoso. As formas de depósito injetáveis também podem ser usadas para retardar a absorção. Essas formas de depósito podem ser preparadas formando matrizes de microcápsulas de um ou mais componentes de vacina, uma rede de polímero biodegradável. Dependendo da razão de polímero para componente de vacina, e da natureza do(s) polímero(s) particular(es) usado(s), a taxa de liberação pode ser controlada.

[162] Exemplos de polímeros biodegradáveis que podem ser usados de acordo com a presente divulgação incluem, por exemplo, poli(ortoésteres) e poli(anidridos). Um polímero exemplificativo particular é polilactida-poliglicolida.

[163] As formulações injetáveis de depósito também podem ser preparadas aprisionando o produto em lipossomas ou microemulsões, que são compatíveis com os tecidos corporais.

[164] Os sistemas de distribuição poliméricos também podem ser usados em formulações de não depósito, incluindo, por exemplo,

formulações orais. Por exemplo, polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, tais como etileno vinil acetato, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres e ácido polilático, etc., podem ser usados em formulações orais. Antígenos polissacarídeos ou conjugados podem ser formulados com tais polímeros, por exemplo, para preparar partículas, micropartículas, extrudados, dispersões sólidas, misturas ou outras combinações para facilitar a preparação de formulações úteis (*por exemplo*, oral).

[165] Vacinas compreendendo uma ou mais proteínas de fusão aqui descritas para uso de acordo com a presente divulgação incluem composições imunogênicas e podem incluir adicionalmente um ou mais agentes ativos adicionais (*isto é*, agentes que exercem um efeito biológico - ingredientes não inertes). Por exemplo, é comum na preparação de vacinas incluir um ou mais adjuvantes. Será apreciado que tais agentes adicionais podem ser formulados juntamente com um ou mais outros componentes da vacina, ou podem ser mantidos separadamente e combinados no momento ou próximo ao momento da administração. Em algumas modalidades, tais componentes adicionais podem ser administrados separadamente de alguns ou todos os outros componentes da vacina, dentro de uma janela de tempo apropriada para que o efeito relevante seja alcançado.

Adjuvantes

[166] As formulações de vacina e composições imunogênicas compreendendo uma proteína de fusão aqui descrita podem incluir um adjuvante. Os adjuvantes, geralmente, são agentes que aumentam a resposta imune a um antígeno. Os adjuvantes podem ser amplamente separados em duas classes, com base em seus principais mecanismos de ação: sistemas de aplicação de vacinas e adjuvantes imunoestimuladores (ver, *por exemplo*, Singh *et al*, 2003). Na maioria das formulações de vacinas, o adjuvante fornece um sinal ao sistema

imunológico para que gere uma resposta ao antígeno, e o antígeno é necessário para conduzir a especificidade da resposta ao patógeno. Os sistemas de distribuição de vacinas são frequentemente formulações em partículas, *por exemplo*, emulsões, micropartículas, complexos imunoestimulantes (ISCOMs), nanopartículas, que podem ser, por exemplo, partículas e/ou matrizes e lipossomas. Em contraste, os adjuvantes imunoestimulatórios são às vezes de ou derivados de patógenos e podem representar padrões moleculares associados a patógenos (PAMP), *por exemplo*, lipopolissacarídeos (LPS), monofosforil lipídeo A (MPL) ou DNA contendo CpG, que ativam células do sistema imunológico inato.

[167] Alternativamente, os adjuvantes podem ser classificados como orgânicos e inorgânicos. Os adjuvantes inorgânicos incluem sais de alúmen, tais como fosfato de alumínio, sulfato de hidroxifosfato de alumínio amorfo e hidróxido de alumínio, que são comumente usados em vacinas humanas. Os adjuvantes orgânicos compreendem moléculas orgânicas incluindo macromoléculas. Exemplos não limitativos de adjuvantes orgânicos incluem toxinas / toxoides da cólera, outras enterotoxinas / toxoides ou toxinas / toxoides lábeis de bactérias Gram-negativas, interleucinas (*por exemplo*, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL- 6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, etc.), interferons (*por exemplo*, interferon gama), fator de estimulação de colônia de macrófagos granulócitos (GM-CSF), fator de estimulação de colônias de macrófagos (M-CSF) e fator de necrose tumoral (TNF).

[168] Os adjuvantes também podem ser classificados pela resposta que induzem. Em algumas modalidades, o adjuvante induz a geração, proliferação ou ativação de células Th1 ou células Th2. Em outras modalidades, o adjuvante induz a geração, proliferação ou ativação de células B. Em ainda outras modalidades, o adjuvante induz a ativação de células apresentadoras de antígeno. Essas categorias

não são mutuamente exclusivas; em alguns casos, um adjuvante ativa mais de um tipo de célula.

[169] Em algumas modalidades, o adjuvante induz a geração, proliferação ou ativação de células Th17. O adjuvante pode promover as células T CD4+ ou CD8+ a secretar IL-17. Em algumas modalidades, um adjuvante que induz a geração, proliferação ou ativação de células Th17 é aquele que produz pelo menos uma amostra experimental de 2 vezes e, em alguns casos, uma amostra experimental de 10 vezes para a razão de controle no ensaio a seguir. No ensaio, um experimentador compara os níveis de IL-17 secretados por duas populações de células: (1) células de animais imunizados com o adjuvante e um polipeptídeo conhecido por induzir geração, proliferação ou ativação de Th17 e (2) células de animais tratados com o adjuvante e um polipeptídeo irrelevante (controle). Um adjuvante que induz a geração, proliferação ou ativação de células Th17 pode fazer com que as células da população (1) produzam mais de 2 vezes ou mais de 10 vezes mais IL-17 do que as células da população (2). IL-17 pode ser medida, por exemplo, por ELISA ou ELISPOT. Certas toxinas, como a toxina da cólera e a toxina lábil (produzida por *E. coli* enterotoxigênica, ou ETEC), ativam uma resposta Th17. Assim, em algumas modalidades, o adjuvante é uma toxina ou toxoide. A toxina da cólera foi usada com sucesso em um modelo de camundongo para induzir imunidade protetora em conjunto com certos polipeptídeos da Tabela 1. Uma forma de toxina lábil é produzida por Intercell. Também podem ser usados derivados mutantes de toxinas lábeis (toxoides) que são ativos como adjuvantes, mas significativamente menos tóxicos. Derivados mutantes desintoxicados exemplificativos de toxina lábil incluem mutantes sem atividade de ADP-ribosiltransferase. Derivados mutantes destoxificados particulares de toxinas lábeis incluem LTK7 (Douce *et al*, 1995) e LTK63 (Williams *et al*, 2004), LT-G192 (Douce *et al*, 1999) e LTR72 (Giuliani *et*

al, 1998).

[170] Em algumas modalidades, o adjuvante compreende uma VLP (partícula semelhante a vírus). Uma dessas plataformas de adjuvantes, replicons de Alphavirus, induz a ativação de células Th17 usando alphavirus e é produzida por Alphavax. Em algumas modalidades do sistema de replicon Alphavirus, alphavirus pode ser projetado para expressar um antígeno de interesse, uma citocina de interesse (por exemplo, IL-17 ou uma citocina que estimula a produção de IL-17), ou ambos, e pode ser produzido em uma linhagem de células auxiliares. Informações mais detalhadas podem ser encontradas em Patente U.S. 5.643.576 e 6.783.939. Em algumas modalidades, uma formulação de vacina é administrada a um sujeito em combinação com um ácido nucleico que codifica uma citocina.

[171] Certas classes de adjuvantes ativam os receptores semelhantes a toll (TLRs) para ativar uma resposta Th17. Os TLRs são proteínas bem conhecidas que podem ser encontradas nas membranas dos leucócitos e reconhecem antígenos estranhos (incluindo antígenos microbianos). A administração de um ligando de TLR conhecido juntamente com um antígeno de interesse (por exemplo, como uma proteína de fusão) pode promover o desenvolvimento de uma resposta imune específica para o antígeno de interesse. Um adjuvante exemplificativo que ativa os TLRs compreende Monofosforil Lipídeo A (MPL). Tradicionalmente, o MPL tem sido produzido como uma endotoxina de lipopolissacarídeo desintoxicado (LPS) obtida de bactérias Gram-negativas, como *S. minnesota*. Em particular, a hidrólise sequencial de ácido e base de LPS produz uma fração de lipídeo A imunoativo (que é MPL), e não possui os grupos sacarídeos e todos, exceto um dos fosfatos presentes no LPS. Vários agonistas de TLR sintéticos (em particular, agonistas de TLR-4) são divulgados em Evans *et al*, 2003. Como os adjuvantes MPL, esses compostos sintéticos

ativam o sistema imunológico inato via TLR. Outro tipo de agonista de TLR é um dímero de fosfolipídeo sintético, por exemplo E6020 (Ishizaka *et al*, 2007). Vários agonistas de TLR (incluindo agonistas de TLR-4) foram produzidos e/ou vendidos, por exemplo, pelo Infectious Disease Research Institute (IRDI), Corixa, Esai, Avanti Polar Lipids, Inc., and Sigma Aldrich. Outro adjuvante exemplificativo que ativa TLRs compreende uma mistura de MPL, dicoinomicolato de trealose (TDM) e brometo de dioctadecildimetilamônio (DDA). Outro adjuvante de ativação de TLR é R848 (resiquimod).

[172] Em algumas modalidades, o adjuvante é ou compreende uma saponina. Normalmente, a saponina é um glicosídeo triterpeno, como os isolados da casca da árvore *Quillaja saponaria*. Um extrato de saponina de uma fonte biológica pode ser posteriormente fracionado (*por exemplo*, por cromatografia) para isolar as porções do extrato com a melhor atividade adjuvante e com toxicidade aceitável. As frações típicas do extrato da árvore *Quillaja saponaria* usadas como adjuvantes são conhecidas como frações A e C.

[173] Em algumas modalidades, combinações de adjuvantes são usadas. Três combinações exemplificativas de adjuvantes são MPL e alum, E6020 e alum, e MPL e um ISCOM.

[174] Os adjuvantes podem ser ligados covalentemente ou não covalentemente aos antígenos. Em algumas modalidades, o adjuvante pode compreender uma proteína que induz respostas inflamatórias por meio da ativação de células apresentadoras de antígeno (APCs). Em algumas modalidades, uma ou mais dessas proteínas podem ser fundidas de forma recombinante com um antígeno de escolha, de modo que a molécula de fusão resultante promova a maturação das células dendríticas, ative as células dendríticas para produzir citocinas e quimiocinas e, finalmente, aprimore a apresentação do antígeno para células T e iniciação de respostas de células T (*por exemplo*, ver Wu *et*

al, 2005).

[175] Em algumas modalidades, uma composição imunogênica ou vacina compreendendo uma proteína de fusão aqui descrita é formulada e/ou administrada em combinação com um adjuvante. Em algumas modalidades, o adjuvante é selecionado do grupo que consiste em fosfato de alumínio, hidróxido de alumínio e fosfato de hidróxido de alumínio. Em algumas modalidades, o adjuvante compreende fosfato de alumínio. Em algumas modalidades, o adjuvante é fosfato de alumínio.

[176] Normalmente, o mesmo adjuvante ou mistura de adjuvantes está presente em cada dose de uma vacina. Opcionalmente, entretanto, um adjuvante pode ser administrado com a primeira dose da vacina e não com as doses subsequentes (*isto é*, doses de reforço). Alternativamente, um adjuvante forte pode ser administrado com a primeira dose de vacina e um adjuvante mais fraco ou uma dose mais baixa do adjuvante forte pode ser administrada com as doses subsequentes. O adjuvante pode ser administrado antes da administração do antígeno, concomitantemente com a administração do antígeno ou após a administração do antígeno a um sujeito (às vezes dentro de 1, 2, 6 ou 12 horas, e às vezes dentro de 1, 2 ou 5 dias). Certos adjuvantes são apropriados para sujeitos humanos, animais não humanos ou ambos.

[177] As vacinas para uso de acordo com a presente divulgação podem incluir, ou ser administradas concomitantemente com, terapia antimicrobiana. Por exemplo, tais vacinas podem incluir ou ser administradas com um ou mais agentes que matam ou retardam o crescimento de um patógeno. Esses agentes incluem, por exemplo, penicilina, vancomicina, eritromicina, azitromicina e claritromicina, cefotaxima, ceftriaxona, levoflaxina, gatifloxacina.

[178] Alternativamente ou adicionalmente, as vacinas para uso de acordo com a presente invenção podem incluir, ou ser administradas

com, uma ou mais outras vacinas ou terapias. Por exemplo, um ou mais antígenos não pneumocócicos podem ser incluídos ou administrados com as vacinas.

Componentes e excipientes adicionais

[179] Além das proteínas de fusão aqui descritas e dos adjuvantes descritos acima, uma formulação de vacina ou composição imunogênica pode incluir um ou mais componentes adicionais.

[180] Em algumas modalidades, a formulação da vacina ou composição imunogênica pode incluir um ou mais estabilizantes, como açúcares (como sacarose, glicose ou frutose), fosfato (como fosfato de sódio dibásico, fosfato de potássio monobásico, fosfato de potássio dibásico ou fosfato monossódico), glutamato (como L-glutamato monossódico), gelatina (como gelatina processada, gelatina hidrolisada ou gelatina porcina), aminoácidos (como arginina, asparagina, histidina, L-histidina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, lisina, fenilalanina, tirosina e os alquil ésteres dos mesmos), inosina ou borato de sódio.

[181] Em algumas modalidades, a formulação de vacina ou composição imunogênica inclui um ou mais tampões, como uma mistura de bicarbonato de sódio e ácido ascórbico. Em algumas modalidades, a formulação da vacina pode ser administrada em solução salina, como solução salina tamponada com fosfato (PBS) ou água destilada.

[182] Em algumas modalidades, a formulação de vacina ou composição imunogênica inclui um ou mais tensoativos, por exemplo, mas não se limitando a, polissorbato 80 (TWEEN 80), polissorbato 20 (TWEEN 20), éter de polietileno glicol p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenil (TRITON X-100) e polímero 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenol com formaldeído e oxirano (TYLOXAPOL). Um tensoativo pode ser iônico ou não iônico.

[183] Em algumas modalidades, a formulação de vacina ou

composição imunogênica inclui um ou mais sais, como cloreto de sódio, cloreto de amônio, cloreto de cálcio ou cloreto de potássio.

[184] Em algumas modalidades, um conservante é incluído na vacina ou composição imunogênica. Em outras modalidades, nenhum conservante é usado. Um conservante é mais frequentemente usado em frascos de vacina de dose múltipla e é menos frequentemente necessário em frascos de vacina de dose única. Em algumas modalidades, o conservante é 2-fenoxietanol, metil e propil parabenos, álcool benzílico e/ou ácido sórbico.

Métodos de Administração

[185] Em algumas modalidades, uma composição imunogênica ou vacina compreendendo uma proteína de fusão aqui descrita é administrada a um sujeito em risco de desenvolver doença pneumocócica, *por exemplo*, um bebê, uma criança pequena, um jovem ou um adulto mais velho. Em algumas modalidades, a composição imunogênica ou vacina é administrada a um sujeito com risco elevado de desenvolver doença pneumocócica, *por exemplo*, sujeitos imunocomprometidos, sujeitos com doença falciforme ou outras hemoglobinopatias, asplenia congênita ou adquirida, disfunção esplênica, insuficiência renal crônica ou síndrome nefrótica, doenças associadas ao tratamento com drogas imunossupressoras ou radioterapia, incluindo neoplasia maligna, leucemia, linfomas, doença de Hodgkin ou transplante de órgão sólido, imunodeficiência congênita ou adquirida, infecção por HIV, vazamentos de líquido cefalorraquidiano, implante(s) coclear(es), doença cardíaca crônica, doença pulmonar crônica, diabetes mellitus, alcoolismo, doença hepática crônica, tabagismo, asma, malignidade generalizada, mieloma múltiplo ou transplante de órgão sólido. Será apreciado que um sujeito pode ser considerado em risco de desenvolver uma doença sem ter sido diagnosticado com quaisquer sintomas da doença. Por exemplo, se o

sujeito é conhecido por ter estado, ou pretende estar, em situações com risco relativamente alto de infecção, esse sujeito será considerado em risco de desenvolver a doença.

[186] Qualquer via de administração eficaz pode ser utilizada, como, por exemplo, oral, nasal, enteral, parenteral, intramuscular ou intravenosa, subcutânea, transdérmica, intradérmica, retal, vaginal, tópica, ocular, pulmonar ou por aplicação de contato. Em algumas modalidades, a composição imunogênica ou vacina pode ser injetada (*por exemplo*, via intramuscular, intraperitoneal, intradérmica e/ou subcutânea); ou distribuída através da mucosa (*por exemplo*, para o trato oral / alimentar, respiratório e/ou geniturinário). A administração intranasal pode ser particularmente útil em alguns contextos, por exemplo, para o tratamento de pneumonia ou otite média (já que o transporte nasofaríngeo de pneumococos pode ser mais eficazmente prevenido, atenuando assim a infecção em seu estágio inicial). Em algumas modalidades, pode ser desejável administrar diferentes doses da composição imunogênica ou vacina por diferentes vias; em algumas modalidades, pode ser desejável administrar diferentes componentes de uma dose por meio de diferentes vias.

[187] Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas (*por exemplo*, composições imunogênicas ou vacinas) são administradas por via intradérmica. A técnica convencional de injeção intradérmica, o "procedimento de Mantoux", consiste em etapas de limpeza da pele e, em seguida, alongamento com uma das mãos, e com o bisel de uma agulha de calibre estreito (calibre 26-31) voltado para cima, a agulha é inserida em um ângulo entre 10-15°. Uma vez que o bisel da agulha é inserido, o cano da agulha é abaixado e mais avançado enquanto fornece uma leve pressão para elevá-lo sob a pele. O líquido é então injetado muito lentamente, formando uma bolha ou protuberância na superfície da pele, seguida pela retirada lenta da

agulha.

[188] Dispositivos que são especificamente projetados para administrar agentes líquidos para dentro ou através da pele foram descritos, por exemplo, os dispositivos descritos em WO 99/34850 e EP 1092444, também os dispositivos de injeção a jato descritos, por exemplo, em WO 01/13977; Patente U.S. 5.480.381, Patente U.S. 5.599.302, Patente U.S. 5.334.144, Patente U.S. 5.993.412, Patente U.S. 5.649.912, Patente U.S. 5.569.189, Patente U.S. 5.704.911, Patente U.S. 5.383.851, Patente U.S. 5.893.397, Patente U.S. 5.466.220, Patente U.S. 5.339.163, Patente U.S. 5.312.335, Patente U.S. 5.503.627, Patente U.S. 5.064.413, Patente U.S. 5.520.639, Patente U.S. 4.596.556, Patente U.S. 4.790.824, Patente U.S. 4.941.880, Patente U.S. 4.940.460, WO 97/37705 e WO 97/13537. Outros métodos de administração intradérmica das composições imunogênicas ou vacinas podem incluir seringas e agulhas convencionais, ou dispositivos projetados para distribuição balística de vacinas sólidas (WO 99/27961), ou adesivos transdérmicos (WO 97/48440; WO 98/28037); ou aplicado à superfície da pele (distribuição transdérmica ou transcutânea WO 98/20734; WO 98/28037).

[189] Conforme descrito acima, as composições farmacêuticas (*por exemplo*, composições imunogênicas ou vacinas) podem ser administradas como uma dose única ou como doses múltiplas. Será apreciado que uma administração é uma "dose" única, desde que todos os componentes relevantes sejam administrados a um sujeito dentro de uma janela de tempo; não é necessário que todos os componentes estejam presentes em uma única composição. Por exemplo, a administração de duas composições imunogênicas ou vacinas diferentes, em um período de menos de 24 h, é considerada uma dose única. Para dar apenas um exemplo, composições imunogênicas ou vacinas com diferentes componentes antigênicos podem ser

administradas em composições separadas, mas como parte de uma dose única. Como observado acima, tais composições separadas podem ser administradas por meio de diferentes vias ou pela mesma via. Alternativamente ou adicionalmente, nas modalidades em que uma composição imunogênica ou vacina é combinada com tipos adicionais de agentes ativos, a composição imunogênica ou vacina pode ser administrada por uma via e um segundo agente ativo pode ser administrado pela mesma via ou por uma via diferente.

[190] As composições farmacêuticas (*por exemplo*, composições imunogênicas ou vacinas) são administradas em tais quantidades e pelo tempo que for necessário para atingir o resultado desejado. Em algumas modalidades da presente invenção, a composição imunogênica ou vacina compreende uma quantidade imunologicamente eficaz de pelo menos uma composição imunogênica. A quantidade exata necessária para atingir uma quantidade imunologicamente eficaz pode variar, dependendo da composição imunogênica e de sujeito para sujeito, dependendo da espécie, idade e condição geral do sujeito, o estágio da doença, a mistura farmacêutica particular, seu modo de administração e semelhantes.

[191] A quantidade de proteína(s) de fusão aqui descrita em cada dose de composição farmacêutica (*por exemplo*, composição imunogênica ou vacina) é selecionada para permitir que a vacina, quando administrada como aqui descrito, induza uma resposta imunoprotetora apropriada sem efeitos colaterais adversos significativos.

[192] Em algumas modalidades, uma composição farmacêutica compreendendo uma proteína de fusão aqui descrita induz uma resposta de células Th1 e/ou Th17 após a administração a um sujeito. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica induz uma resposta opsônica / bactericida contra *S. pneumoniae* após a

administração a um sujeito. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica que compreende uma proteína de fusão aqui divulgada reduz a taxa de transmissão e/ou colonização das superfícies mucosas por *Streptococcus pneumoniae* após administração a um sujeito. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica reduz a taxa de transmissão e/ou colonização da nasofaringe ou dos pulmões por *S. pneumoniae* após a transmissão.

[193] Algumas modalidades fornecem um método de imunização de um sujeito contra a infecção por *S. pneumoniae*, compreendendo administrar ao sujeito de uma quantidade imunologicamente eficaz de uma composição imunogênica compreendendo uma proteína de fusão aqui descrita. Algumas modalidades fornecem um método de imunização de um sujeito contra a infecção por *S. pneumoniae*, compreendendo administrar ao sujeito uma quantidade imunologicamente eficaz de uma composição de vacina compreendendo uma proteína de fusão aqui descrita. Algumas modalidades fornecem um método de imunização de um sujeito contra a infecção por *S. pneumoniae*, compreendendo administrar ao sujeito de uma quantidade imunologicamente eficaz de uma composição farmacêutica compreendendo uma proteína de fusão aqui descrita.

Profilaxia de combinação ou Terapia combinada

[194] Em algumas modalidades, uma composição imunogênica ou vacina compreendendo uma proteína de fusão aqui descrita pode ser administrada em combinação com outro agente. Em algumas modalidades, o agente é ou compreende PCV13. Em algumas modalidades, o agente é ou compreende PPSV23. Em algumas modalidades, o agente é ou compreende um antibiótico.

Dosagem

[195] Em algumas modalidades, a administração de uma composição imunogênica ou vacina compreendendo uma proteína de

fusão aqui descrita pode envolver a distribuição de uma dose única. Em algumas modalidades, a administração pode envolver uma dose inicial seguida por uma ou várias doses de imunização adicionais, adequadamente espaçadas. Um cronograma de imunização é um programa para a administração de uma ou mais doses especificadas de uma ou mais vacinas pneumocócicas especificadas, por uma ou mais vias de administração especificadas, em uma ou mais idades especificadas de um sujeito.

[196] A presente divulgação fornece métodos de imunização que envolvem a administração de pelo menos uma dose de uma vacina a um sujeito infantil. Em algumas modalidades, o sujeito infantil possui 18 meses ou menos. Em algumas modalidades, o sujeito infantil possui 12 meses ou menos. Em algumas modalidades, o sujeito infantil recebeu anteriormente uma ou mais doses de uma vacina pneumocócica polissacarídica conjugada; em outras modalidades, o sujeito infantil é virgem às vacinas pneumocócicas. Em algumas modalidades, o sujeito infantil foi previamente infectado ou exposto à infecção por *S. pneumoniae*.

[197] A presente divulgação fornece métodos de imunização que envolvem a administração de pelo menos uma dose de uma vacina a um sujeito bebê. Em algumas modalidades, o sujeito infantil possui 5 anos ou menos. Em algumas modalidades, o sujeito infantil possui 4 anos ou menos. Em algumas modalidades, o sujeito bebê recebeu anteriormente uma ou mais doses de uma vacina pneumocócica polissacarídica conjugada; em outras modalidades, o sujeito bebê é virgem às vacinas pneumocócicas. Em algumas modalidades, o sujeito bebê foi previamente infectado ou exposto à infecção por *S. pneumoniae*.

[198] A presente divulgação fornece métodos de imunização que envolvem a administração de pelo menos uma dose de uma vacina a

um sujeito juvenil. Em algumas modalidades, o sujeito juvenil possui 18 anos ou menos. Em algumas modalidades, o sujeito juvenil possui 15 anos ou menos. Em algumas modalidades, o sujeito juvenil recebeu anteriormente uma ou mais doses de uma vacina pneumocócica polissacarídica conjugada; em outras modalidades, o sujeito juvenil é virgem às vacinas pneumocócicas. Em algumas modalidades, o sujeito juvenil foi previamente infectado ou exposto à infecção por *S. pneumoniae*.

[199] A presente divulgação fornece métodos de imunização que envolvem a administração de pelo menos uma dose de uma vacina a um sujeito adulto. Em algumas modalidades, o sujeito adulto possui mais de cerca de 50 anos de idade. Em algumas modalidades, o sujeito adulto possui mais de cerca de 65 anos de idade. Em algumas modalidades, o sujeito adulto recebeu anteriormente uma ou mais doses de uma vacina pneumocócica polissacarídica conjugada; em outras modalidades, o sujeito adulto é virgem às vacinas pneumocócicas. Em algumas modalidades, o sujeito adulto foi previamente infectado ou exposto à infecção por *S. pneumoniae*.

[200] Os esquemas de imunização da presente divulgação são fornecidos para induzir uma resposta imune (*por exemplo*, uma resposta imunoprotetora) em um sujeito suficiente para reduzir pelo menos uma medida selecionada do grupo que consiste em incidência, prevalência, frequência e/ou gravidade de pelo menos um infecção, doença ou distúrbio e/ou pelo menos um marcador substituto da infecção, doença ou distúrbio, em uma população e/ou subpopulação do(s) sujeito(s). Um programa de imunização suplementar é aquele que possui esse efeito em relação ao programa padrão que complementa. Um cronograma suplementar pode exigir administrações adicionais e/ou doses supra-imunogênicas das composições imunogênicas ou vacinas aqui divulgadas, encontradas no cronograma padrão, ou para a

administração de composições imunogênicas ou vacinas que não fazem parte do cronograma padrão. Um programa de imunização completo da presente invenção pode compreender um programa padrão e um programa suplementar. Exemplos de esquemas de imunização de amostra são fornecidos para fins ilustrativos. Descrições detalhadas de métodos para avaliar a resposta imunogênica discutidos aqui permitem desenvolver alterações nos esquemas de imunização de amostra sem experimentação indevida.

[201] Em uma modalidade da presente divulgação, uma primeira administração de uma vacina pneumocócica geralmente ocorre quando um sujeito possui mais que cerca de 2 semanas, mais que cerca de 5 semanas, mais que cerca de 1 ano, mais que cerca de 2 anos, mais de cerca de 15 anos, ou mais que cerca de 18 anos.

[202] Em uma modalidade da presente divulgação, uma primeira administração de uma vacina pneumocócica geralmente ocorre quando um sujeito possui mais que cerca de 50 anos, mais que cerca de 55 anos, mais que cerca de 60 anos, mais que cerca de 65 anos, ou mais que cerca de 70 anos.

[203] Em algumas modalidades da divulgação, uma única administração de vacina é usada. É possível que os objetivos da presente invenção possam ser servidos com uma única administração, especialmente quando um ou mais polipeptídeos de vacina utilizados, polissacarídeo(s) e/ou conjugado(s) ou combinações dos mesmos são fortes, e em tal situação, um esquema de dose única é suficiente para induzir uma resposta imunoprotetora duradoura.

[204] Em algumas modalidades, é desejável administrar duas ou mais doses de vacina, para maior eficácia e cobertura imunoprotetora. Assim, em algumas modalidades, uma série de doses é pelo menos duas, pelo menos três ou mais doses. Não existe um número máximo de doses definido, no entanto, é uma boa prática clínica não imunizar

mais frequentemente do que o necessário para obter o efeito desejado.

[205] Sem estar limitado pela teoria, uma primeira dose de vacina administrada de acordo com a divulgação pode ser considerada uma dose de “iniciação”. Em algumas modalidades, mais de uma dose é incluída em um cronograma de imunização. Em tal cenário, uma dose subsequente pode ser considerada uma dose de “reforço”.

[206] Uma dose inicial pode ser administrada a um sujeito virgem (um sujeito que nunca recebeu anteriormente uma vacina polissacarídica conjugada). Em algumas modalidades, uma dose inicial pode ser administrada a um sujeito que recebeu anteriormente a vacina polissacarídica conjugada pelo menos cinco ou mais anos antes da administração de uma dose inicial de vacina de acordo com a invenção. Em outras modalidades, uma dose inicial pode ser administrada a um sujeito que recebeu anteriormente uma vacina polissacarídica conjugada pelo menos vinte ou mais anos antes da administração de uma vacina inicial de acordo com a invenção.

[207] Quando um esquema de imunização exige duas ou mais doses separadas, o intervalo entre as doses é considerado. O intervalo entre duas doses sucessivas pode ser o mesmo ao longo de um programa de imunização ou pode mudar à medida que o sujeito envelhece. Nos esquemas de imunização da presente invenção, uma vez que uma primeira dose de vacina foi administrada, há um primeiro intervalo antes da administração de uma dose subsequente. Um primeiro intervalo é geralmente de pelo menos cerca de 2 semanas, 1 mês, 6 semanas, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 9 meses, 12 meses ou mais. Quando mais de uma dose(s) subsequente(s) é(são) administradas, segundos (ou mais) intervalos podem ser fornecidos entre tais doses subsequentes. Em algumas modalidades, todos os intervalos entre as doses subsequentes são do mesmo comprimento; em outras modalidades, os segundos intervalos podem variar em

comprimento. Em algumas modalidades, o intervalo entre as doses subsequentes pode ser de pelo menos cerca de 12 meses, pelo menos cerca de 15 meses, pelo menos cerca de 18 meses, pelo menos cerca de 21 meses ou pelo menos cerca de 2 anos. Em algumas modalidades, o intervalo entre as doses pode ser de até 3 anos, até cerca de 4 anos, ou até cerca de 5 anos ou 10 anos ou mais. Em algumas modalidades, os intervalos entre as doses subsequentes podem diminuir à medida que o sujeito envelhece.

[208] Será apreciado por aqueles versados na técnica que uma variedade de combinações e subcombinações possíveis das várias condições de tempo da primeira administração, intervalo mais curto, maior intervalo e número total de administrações (em termos absolutos, ou dentro de um determinado período) existem, e todas essas combinações e subcombinações devem ser consideradas como estando dentro da contemplação do inventor, embora não explicitamente enumeradas aqui.

Ensaios para determinar a resposta imunológica

[209] Em algumas modalidades, um método de avaliação da imunogenicidade de uma composição farmacêutica, composição imunogênica ou vacina compreendendo uma proteína de fusão aqui descrita compreende avaliar, medir e/ou comparar uma resposta imune usando um ou mais bioensaios *in vitro*, incluindo respostas de células T e células B, como níveis de anticorpos por ELISA, ELISA multiplex, MSD, Luminex, citometria de fluxo, resposta de células Th1 / Th17, medição do nível de citocinas e níveis de anticorpos funcionais medidos por OPK, eliminação de bactericida sérico (SBA), aglutinação, motilidade, citotoxicidade, ou adesão; e ensaios *in vivo* em modelos animais de doença pneumocócica (*por exemplo*, pneumonia, bacteremia, meningite, sepse, otite média, colonização nasofaríngea). Os parâmetros dos ensaios *in vivo* incluem eliminação bacteriana das

superfícies mucosas ou corrente sanguínea, redução ou prevenção de bacteremia, meningite, sepse ou otite média, redução ou prevenção da colonização da nasofaringe, redução da mortalidade e proteção passiva e ativa após o desafio com o patógenos pneumocócicos que são os alvos da composição imunogênica. Em algumas modalidades, a resposta imune é comparada a uma composição de controle.

[210] Em algumas modalidades, um método de avaliação da potência de uma composição farmacêutica, composição imunogênica ou vacina compreendendo uma proteína de fusão aqui descrita compreende avaliar, medir e/ou comparar uma resposta imune usando um ou mais bioensaios *in vitro*, incluindo respostas de células T e células B, como níveis de anticorpos por ELISA, ELISA multiplex, MSD, Luminex, citometria de fluxo, resposta de células Th1 / Th17, medição do nível de citocinas e níveis de anticorpos funcionais medidos por OPK, eliminação de bactericida sérico (SBA), internalização, neutralização de atividade, aglutinação, motilidade, citotoxicidade, ou adesão; e ensaios *in vivo* em modelos animais de doença pneumocócica (*por exemplo*, pneumonia, bacteremia, meningite, sepse, otite média, colonização nasofaríngea). Os parâmetros incluem eliminação ou redução bacteriana das superfícies mucosas ou corrente sanguínea, redução ou prevenção de bacteremia, meningite, sepse ou otite média, redução ou prevenção da colonização da nasofaringe, redução da mortalidade e proteção passiva e ativa após o desafio com os patógenos pneumocócicos que são os alvos da composição imunogênica. Em algumas modalidades, a resposta imune é comparada a uma composição de controle.

[211] De um modo geral, pode ser desejável avaliar as respostas humorais, respostas celulares e/ou interações entre os dois**.** Quando as respostas humorais estão sendo avaliadas, os títulos e/ou tipos de anticorpos (*por exemplo*, IgG total, IgG1, IgG2, IgM, IgA, etc.) para

antígenos de patógenos específicos (*por exemplo*, polipeptídeos ou polissacarídeos, específicos para sorotipos ou conservados em dois ou mais sorotipos) podem ser determinados, por exemplo, antes e/ou após a administração de uma dose inicial ou de reforço da vacina (e/ou em comparação com os níveis de anticorpos na ausência de estimulação antigênica). As respostas celulares podem ser avaliadas monitorando as reações, como respostas de hipersensibilidade do tipo retardado, etc., aos antígenos. As respostas celulares também podem ser medidas diretamente avaliando a resposta dos monócitos das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) à estimulação com os antígenos de interesse. Populações de células B precursoras e de memória podem ser avaliadas em ensaios de imunoensaio enzimático (ELISpot) direcionados contra antígenos de patógenos específicos.

[212] O método RIA detecta anticorpos específicos através da incubação de soros com polissacarídeos radiomarcados ou polipeptídeos em suspensão (*por exemplo*, Schiffiman *et al*, 1980). Os complexos antígeno-anticorpo são então precipitados com sulfato de amônio e os grânulos radiomarcados testados para contagens por minuto (cpm).

[213] No método de detecção de ELISA, os anticorpos específicos do soro de sujeitos vacinados são quantificados por incubação com antígenos (*por exemplo*, polipeptídeos ou polissacarídeos, específicos para sorotipos ou conservados em dois ou mais sorotipos) que foram adsorvidos a um suporte sólido (*por exemplo*, Koskela and Leinonen (1981); Kojima *et al*, 1990; Concepcion and Frasch, 2001). O anticorpo ligado é detectado usando anticorpos de detecção secundária conjugados com enzima. O ELISA também permite a isotipagem e subclasse da resposta imune (*isto é*, IgM vs. IgG ou IgG1 vs. IgG2) usando anticorpos secundários específicos de isotipo ou subclasse e pode ser adaptado para avaliar a avidez dos anticorpos (Anttila *et al*,

1998; Romero-Steiner *et al*, 2005). Os ensaios multiplex (*por exemplo*, Luminex) facilitam a detecção simultânea de anticorpos para vários antígenos. Os antígenos são conjugados a microesferas espectralmente distintas que são misturadas e incubadas com soro. Os anticorpos ligados aos antígenos nas microesferas revestidas são detectados usando um anticorpo secundário (*por exemplo*, IgG anti-humano de cabra conjugado com R-ficoeritrina).

[214] Uma abordagem para avaliar o anticorpo funcional no soro é o ensaio opsonofagocítico (OPA), que quantifica apenas os anticorpos que podem opsonizar a bactéria, levando à ingestão e morte da bactéria. O ensaio padrão utiliza uma célula efetora fagocitária humana, uma fonte de complemento, bactérias e soros diluídos. A leitura do ensaio é o título final do soro no qual s ≥50% de morte em comparação com bactérias incubadas com complemento e células humanas sozinhas (Romero-Steiner *et al*, 1997). Este OPA de eliminação também pode ser multiplexado utilizando cepas alvo de patógenos que carregam diferentes marcadores de resistência a antibióticos (Kim *et al*, 2003). Outro tipo de ensaio opsônico multiplex é um ensaio de não eliminação em que a absorção por células efetoras fagocíticas de patógeno encapsulado corado com fluorescência ou microesferas fluorescentes conjugadas com antígenos de um patógeno alvo na presença de soro diluído mais uma fonte de complemento é avaliada por FC (Martinez *et al*, 1999). A atividade opsônica do anticorpo sérico mais complemento também pode ser avaliada medindo a resposta oxidativa de células efetoras humanas fagocíticas ao patógeno ingerido (Munro *et al*. 1985; Ojo-Amaize *et al*. 1995).

[215] Certos sistemas de modelo *in vivo* podem ser usados para avaliar a proteção conferida por anticorpos séricos induzidos por composições imunogênicas ou vacinas compreendendo uma proteína de fusão aqui descrita. Em tais sistemas de proteção passiva,

camundongos ou ratos são desafiados com o patógeno mais soros diluídos, e o título final do soro que fornece proteção contra pneumonia, bacteremia, colonização de órgãos ou tecidos, ou mortalidade é determinado (Stack *et al*. 1998; Saeland *et al*. 2000).

[216] Em algumas modalidades, a eficácia da imunização pode ser determinada pelo ensaio de um ou mais níveis de citocinas estimulando células T de um sujeito após a imunização. O um ou mais níveis de citocinas podem ser comparados com um ou mais níveis de citocinas no mesmo sujeito antes da imunização. Níveis aumentados de uma ou mais citocinas, como um aumento de 1,5 vezes, 2 vezes, 5 vezes, 10 vezes, 20 vezes, 50 vezes ou 100 vezes ou mais em relação aos níveis de citocinas pré-imunização, indicariam uma resposta aumentada à composição imunogênica ou vacina. Em algumas modalidades, uma ou mais citocinas são selecionadas de GM-CSP; IL-1α; IL-1β; IL-2; IL-3; IL-4; IL-5; IL-6; IL-7; IL-8; IL-10; IL-12; IL-17A, IL-17F ou outros membros da família IL-17; IL-22; IL-23; IFN-α; IFN-β; IFN-γ; MIP-1α; MIP-1β; TGF-β; TNFα, ou TNF-β. Em um exemplo não limitativo, a eficácia da imunização pode ser determinada pelo ensaio dos níveis de IL-17 (particularmente IL-17A) estimulando células T de um sujeito após a imunização. Os níveis de IL-17 podem ser comparados aos níveis de IL-17 no mesmo sujeito antes da imunização. Níveis aumentados de IL-17 (*por exemplo*, IL-17A), como um aumento de 1,5 vezes, 2 vezes, 5 vezes, 10 vezes, 20 vezes, 50 vezes ou 100 vezes ou mais, indicariam uma resposta aumentada à composição imunogênica ou vacina.

[217] Em algumas modalidades, pode-se testar neutrófilos na presença de células T ou anticorpos do paciente para morte pneumocócica. O aumento da morte pneumocócica, como um aumento de 1,5 vezes, 2 vezes, 5 vezes, 10 vezes, 20 vezes, 50 vezes ou 100 vezes ou mais, indicaria um aumento da resposta à composição imunogênica ou vacina. Por exemplo, pode-se medir a ativação de

células Th17, onde o aumento da ativação de células Th17, como um aumento de 1,5 vezes, 2 vezes, 5 vezes, 10 vezes, 20 vezes, 50 vezes ou 100 vezes ou mais, correlaciona com uma resposta aumentada à composição imunogênica ou vacina. Em outro exemplo não limitativo, pode-se medir a ativação de células Th1, em que o aumento da ativação de células Th1, como 1,5 vezes, 2 vezes, 5 vezes, 10 vezes, 20 vezes, 50 vezes ou 100 vezes ou mais aumento, correlaciona-se com um aumento da resposta à composição imunogênica ou vacina. Pode-se também medir os níveis de um anticorpo específico para a composição imunogênica ou vacina, onde níveis aumentados do anticorpo específico, como 1,5 vezes, 2 vezes, 5 vezes, 10 vezes, 20 vezes, 50 vezes ou 100 vezes ou mais aumento, estão correlacionados com o aumento da eficácia. Em algumas modalidades, dois ou mais desses ensaios são usados. Por exemplo, pode-se medir os níveis de IL-17 e os níveis de composição imunogênica ou anticorpo específico da vacina. Alternativamente, pode-se seguir marcadores epidemiológicos, como incidência, gravidade ou duração da infecção pneumocócica em indivíduos vacinados em comparação com indivíduos não vacinados.

[218] A composição imunogênica ou a eficácia da vacina também podem ser avaliadas em vários sistemas modelo, como o modelo de desafio de camundongo. Por exemplo, as cepas de camundongos BALB / c ou C57BL / 6 podem ser usadas. Depois de administrar a composição imunogênica de teste ou vacina a um sujeito (como uma dose única ou doses múltiplas), o experimentador administra uma dose de desafio de *S. pneumoniae*. Em alguns casos, uma dose de desafio administrada por via intranasal é suficiente para causar colonização por *S. pneumoniae* (especialmente colonização nasal) em um animal não vacinado e, em alguns casos, uma dose de desafio administrada por aspiração é suficiente para causar sepse e uma alta taxa de letalidade em animais não vacinados. Em alguns casos, uma dose de desafio

administrada via injeção intraperitoneal é suficiente para causar sepse e uma alta taxa de letalidade em animais não vacinados. Em alguns casos, uma dose de desafio administrada por injeção intravenosa é suficiente para causar sepse e uma alta taxa de letalidade em animais não vacinados. Pode-se então medir a redução da colonização ou a redução da letalidade em animais vacinados.

[219] Certos sistemas modelo *in vivo* podem ser usados para avaliar a proteção proporcionada por anticorpos séricos induzidos por vacinas da presente invenção. Em tais sistemas de proteção passiva, camundongos ou ratos são desafiados com o patógeno mais soros diluídos, e o título final do soro que fornece proteção contra bacteremia, colonização de órgãos ou tecidos, ou mortalidade é determinado (Stack *et al*. 1998; Saeland *et al*. 2000).

Exemplificação

Exemplo 1: Indução da resposta Th17 e proteção da colonização pneumocócica nasal em camundongos mediada pelos componentes SP0785 e SP1500 da proteína de fusão CP1

Objetivo:

[220] Este exemplo compara a capacidade das proteínas individuais de *Streptococcus pneumoniae* SP0785 e SP1500 com uma proteína de fusão CP1 exemplificativa para estimular uma resposta Th17 e proteger camundongos da colonização nasal com *S. pneumoniae* após imunização nasal com a toxina cólera adjuvante (CT). Uma proteína de fusão CP1 exemplificativa é uma proteína de fusão compreendendo uma rizavidina truncada (aminoácidos [45-179], denotado Rhavi), um polipeptídeo SP0785 e um polipeptídeo SP1500. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão CP1 é ou compreende Rhavi-ligante (GGGGSSS)-SP1500-ligante (AAA)-SP0785.

Sumário:

1. As proteínas de*S. pneumoniae* SP0785 e SP1500 e a proteína de fusão CP1 podem gerar, cada uma, uma resposta Th17 robusta em camundongos, conforme demonstrado pela secreção de interleucina 17A (IL-17A) após imunização intranasal com a toxina cólera adjuvante (CT).

2. A colonização nasal de *S. pneumoniae* foi significativamente reduzida por imunizações intranasais separadas de camundongos com SP1500 ou SP0785 e CT, ou com CP1 e CT.

Materiais e Métodos:

Produção de proteína recombinante

[221] Proteínas recombinantes marcadas com histidina foram expressas em *Escherichia coli* e purificadas usando cromatografia de afinidade com ácido Ni-nitrilotriacético. Uma segunda purificação foi executada com cromatografia de exclusão de tamanho com uma coluna Superdex 200. A concentração de proteína foi medida usando um kit de ensaio de proteína de ácido bicinconínico (BCA) (Bio-Rad).

Formulação

[222] A toxina da cólera (CT) foi usada como adjuvante para imunização intranasal para facilitar a indução de respostas de células T a proteínas sozinhas. Proteínas ou vacina de células inteiras pneumocócicas (quantidade indicada na Tabela 5) foram misturadas com 1 µg de CT em solução salina em um volume final de 20 µl por dose antes da administração.

Protocolo de imunização de camundongo intranasal

[223] Para imunização intranasal com proteínas com adjuvante CT e vacina pneumocócica de células inteiras com inativação de clorofórmio (WCC), camundongos C57BL / 6 (grupos de n = 10) receberam 2 imunizações com intervalo de 1 semana. Amostras de sangue periférico foram colhidas 3 semanas após a última imunização para estimulação de IL-17A *ex vivo* na presença de antígeno(s)

apropriado(s) como estimulante.

Tabela 5. Grupos de estudo de imunização intranasal de camundongo

Grupo	Antígeno	Dose (Proteína)	Adjuvante	# de camundongos	Cronograma de imunização (dias)	Coleta de sangue (dias)
A	-	-	CT	10	0,7	28
B	SP0785	10µg	CT	10	0,7	28
C	-	-	CT	10	0,7	28
D	SP1500	10µg	CT	10	0,7	28
E	CP1	15µg	CT	10	0,7	28
F	Rhavi	15µg	CT	10	0,7	28
G	WCC	100µg	CT	10	0,7	28

Abreviaturas: CP1: proteína de fusão 1 (Rhavi-ligante (GGGGSSS)-SP1500-ligante (AAA)-SP0785); Rhavi: rizavidina truncada, aminoácidos [45-179]; WCC: vacina pneumocócica de células inteiras (inativação do clorofórmio); CT: toxina da cólera

Nota: todas as proteínas recombinantes foram marcadas com His.

Indução de IL-17A e medição de sangue total

[224] *A estimulação* ex vivo de amostras de sangue periférico colhidas 3 semanas após a última imunização intranasal foi realizada em placas de fundo redondo de 96 poços. Todos os estimulantes foram diluídos em meio de estimulação (DMEM F-12; FBS a 10%, 2-mercaptoetanol 50 µM, ciprofloxacina 10 µg / ml) a uma concentração final de 10 µg / ml. Em cada poço, 25 µl de sangue heparinizado foram adicionados a 225 µl de meio de estimulação contendo os estimulantes indicados, seguido de incubação a 37°C com 5% de CO_2 durante 6 dias. Os sobrenadantes foram coletados após centrifugação, e IL-17A foi analisado com um kit ELISA (R&D systems).

Infecção nasofaríngea por S. pneumoniae e medição da colonização

[225] Uma a 2 semanas após a coleta de sangue, os

camundongos foram desafiados intranasalmente com 10^7 CFU de pneumococos do tipo 6B (cepa 603). A lavagem nasofaríngea em camundongos sacrificados foi realizada 7 dias após a infecção. As CFU de *S. pneumoniae* por lavagem nasal foram calculadas após o crescimento em placas de ágar de sangue.

Análises estatísticas

[226] As análises estatísticas foram realizadas com o PRISM (GraphPad Software). Todos os dados sobre a concentração de IL-17A e densidades de colonização nasofaríngea foram analisados usando o teste U de Mann-Whitney. As concentrações médias geométricas de IL-17A foram calculadas para cada grupo e a densidade média geométrica de colonização foi calculada para cada grupo.

Resultados e Discussão:

Resposta de IL-17A e redução na colonização após imunização intranasal com SP1500, SP0785 ou CP1.

[227] Como visto na Figura 2, painel esquerdo, a imunização intranasal com SP0785 ou SP1500 adjuvado com CT induziu uma forte resposta Th17 específica de antígeno em comparação com a imunização com CT sozinha, conforme indicado pelo aumento da produção de IL-17A após estimulação *ex vivo* de sangue periférico com SP0785 ou SP1500 purificado. O aumento da secreção de IL-17A correlacionou-se com uma redução estatisticamente significativa correspondente em *S. pneumoniae* CFU recuperado da lavagem nasofaríngea 7 dias após o desafio de camundongos imunizados (Figura 2, painel direito).

[228] Como visto na Figura 3, painel esquerdo, quando a proteína Rhavi foi comparada com a fusão da proteína Rhavi-ligante (GGGGSSS)-SP1500-ligante (AAA)-SP0785 (CP1) após a imunização intranasal com CT, CP1 reteve a indução específica do antígeno de IL-17A. Quando esses camundongos foram desafiados com *S.*

pneumoniae e comparados com a imunização intranasal da vacina pneumocócica de células inteiras, Rhavi sozinho não teve efeito protetor conforme medido por CFU pneumocócica, enquanto CP1 teve um efeito protetor que foi comparável a células inteiras pneumocócicas mortas (inativadas) (Figura 3, painel direito).

Exemplo 2: Atividade de eliminação de antissoros contra a proteína de fusão CP1

Materiais e métodos:

Crescimento de bactérias

[229] As cepas 6B, 15A, 16F e 35B de *S. pneumoniae* foram inoculadas em culturas de 10 mL de Todd Hewitt Broth (THB) com extrato de levedura. As culturas foram incubadas a 37°C em 5% de CO_2 por 4 a 7 horas até que a OD_{600} atingisse 0,5 - 0,8 (fase logarítmica média). As bactérias foram colhidas girando por 7 minutos a 3.000 g a 4°C e o pelete bacteriano foi ressuspenso em 10 mL de THB com 10% de glicerol com armazenamento a -80°C. As estimativas da unidade formadora de colônia (CFU) foram determinadas por diluições em série de estoques congelados em ágar Trypticase de soja com 5% de sangue de ovelha (Becton, Dickenson, and Company) com 37°C em 5% de incubações com CO_2 por 18 a 24 horas.

Ensaio opsonofagocítico concentrado (COPA)

[230] Os estoques congelados de *S. pneumoniae* foram descongelados e ressuspensos a 2 x 10^5CFU/ml em tampão de ensaio (solução salina tamponada de Hank com 10% de FBS inativado por calor). A uma placa de 96 poços, 10 µl de suspensão de bactérias foram adicionados a cada poço seguidos por 20 µl de soro de coelho inativado por calor diluído em tampão de ensaio para ser testado no ensaio. As bactérias e o soro de coelho foram incubados à temperatura ambiente durante 30 min com agitação. A cada poço, foram adicionados 10 µl de complemento de coelho bebê (Pel-Freeze Biologicals), seguido por

incubação à temperatura ambiente por 30 min com agitação. As células HL60 (ATCC) foram lavadas com tampão de ensaio e ressuspendidas para 1 x 10^7 células / ml. A cada poço, foram adicionados 40 µl de suspensão de HL60 (razão de HL60 para bactérias de 200:1) seguido por incubação com agitação a 37°C com 5% de CO_2 durante 1 hora. A placa foi transferida para gelo e incubada durante 20 minutos. Cada amostra (não diluída, diluições 1/5 e 1/25 em água) foi então semeada em placas de ágar de sangue a 5%. Após incubação durante a noite a 37°C com 5% de CO_2, as CFU foram contadas para cada amostra e diluição.

Soro de coelho

[231] Coelhos brancos da Nova Zelândia (n = 3) foram imunizados com 100 ug de Rhavi-ligante (GGGGSSS)-SP1500-ligante (AAA)-SP0785 (CP1, marcado com His) e 0,625 mg de alumínio elementar de $AlPO_4$ por dose para um total de três doses com duas semanas entre cada imunização (coelhos 87, 88 e 1762). Os soros foram coletados antes da imunização (P0) e duas semanas após a terceira imunização (P3) e armazenados a -80°C.

Resultados e Discussão:

Atividade opsonofagocítica de S. pneumoniae de anticorpos dirigidos contra CP1

[232] Um ensaio opsonofagocítico concentrado modificado (COPA) foi estabelecido para investigar a morte mediada por anticorpos de proteínas de *S. pneumoniae*. Os soros de dois coelhos imunizados com CP1 (P3 dos coelhos 87 e 88) foram analisados em comparação com os soros pré-imunes (P0). Em todas as diluições testadas para ambos os coelhos, a incubação com o soro imune P3 resultou em uma redução da CFU (Figura 4), ou na exibição alternativa dos mesmos resultados, um aumento na porcentagem de atividade de morte (Figura 7, Painel A), em comparação à incubação com o soro pré-imune (P0)

para *S. pneumoniae* sorotipo 6B, um tipo incorporado na vacina Prevnar 13 disponível comercialmente. A atividade de eliminação do soro imune era dependente de ambas as células HL60 e do complemento ativo (dados não mostrados). Os mesmos soros foram testados em dois sorotipos não incorporados em vacinas disponíveis comercialmente, *S. pneumoniae* sorotipo 15A (Figura 5 e Figura 7, Painel B: diluição 1/2) e sorotipo 35B (Figura 6 e Figura 7, Painel C: 1 / 2 diluição). O soro de um terceiro coelho imunizado com CP1 (P3 do coelho 1762) foi testado em comparação com o soro pré-imune (P0) contra *S. pneumoniae* sorotipo 16F, um outro sorotipo não incorporado em vacinas comercialmente disponíveis (Figura 7, Painel D: Diluições de 1/2, 1/6, 1/18, 1/54). Para todos os coelhos e sorotipos não vacinais testados, a incubação com os soros imunes P3 resultou em uma redução da CFU, ou alternativamente exibido, um aumento na porcentagem de atividade de morte, em comparação com a incubação com os soros pré-imunes (P0). A atividade de eliminação do soro imune era dependente de ambas as células HL60 e do complemento ativo (dados não mostrados).

Exemplo 3: Comparação da indução da resposta Th17 em camundongos após imunização com uma mistura (não conjugada) de SP0785, SP1500 e uma proteína rizavidina truncada Rhavi, ou com proteínas de fusão CP1 ou SP0785-ligante (SSSGG)-SP1500-ligante (SSVDKL)-PdT

Materiais e métodos:

Produção de proteína recombinante

[233] Proteínas recombinantes marcadas com histidina foram expressas em *Escherichia coli* e purificadas usando cromatografia de afinidade com ácido Ni-nitrilotriacético. Uma segunda purificação foi executada com cromatografia de exclusão de tamanho com uma coluna Superdex 200. A concentração de proteína foi medida usando um kit de ensaio de proteína de ácido bicinconínico (BCA) (Bio-Rad).

Formulação

[234] A toxina da cólera (CT) foi usada como adjuvante para imunização intranasal para facilitar a indução de respostas de células T a proteínas sozinhas. Proteínas (quantidade indicada na Tabela 6) foram misturadas com 1 µg de CT em solução salina em um volume final de 20 µl por dose antes da administração.

Protocolo de imunização de camundongo intranasal

[235] Para imunização intranasal com proteínas adjuvadas com CT, os camundongos C57BL / 6 (grupos de n = 15) receberam 2 imunizações com intervalo de 1 semana. Amostras de sangue periférico foram colhidas 3 semanas após a última imunização para estimulação de IL-17A *ex vivo* na presença de antígeno(s) apropriado(s) como estimulante.

Tabela 6. Grupos de estudo de imunização intranasal de camundongo

Grupo	Antígeno	Dose (Proteína)	Adjuvante	# de camundongos	Cronograma de imunização (dias)	Coleta de sangue (dias)
A	-	-	CT	15	0,7	28
B	CP1	10 µg	CT	15	0,7	28
C	Mistura Rhavi + SP0785 + SP1500	10 µg	CT	15	0,7	28
D	SP0785-ligante (SSSGG)-SP1500-ligante (SSVDKL)-PdT	17 µg	CT	15	0,7	28
E	SP0785	10 µg	CT	15	0,7	28
F	SP1500	10 µg	CT	15	0,7	28

Abreviaturas: CP1: proteína de fusão 1 (Rhavi-ligante (GGGGSSS)-SP1500-ligante (AAA)-SP0785); Rhavi: rizavidina truncada, aminoácidos [45-179]; CT: toxina da cólera

Nota: todas as proteínas recombinantes foram marcadas com His.

Indução de IL-17A e medição de sangue total

[236] A estimulação*ex vivo* de amostras de sangue periférico colhidas 3 semanas após a última imunização intranasal foi realizada em placas de fundo redondo de 96 poços. Todos os estimulantes (proteínas purificadas ou células inteiras de pneumococo mortas (inativadas)) foram diluídos em meio de estimulação (DMEM F-12; FBS a 10%, 2-mercaptoetanol 50 µM, ciprofloxacina 10 µg / ml) a uma concentração final de 10 µg / ml. Em cada poço, 25 µl de sangue heparinizado foram adicionados a 225 µl de meio de estimulação contendo os estimulantes indicados, seguido de incubação a 37°C com 5% de CO_2 durante 6 dias. Os sobrenadantes foram coletados após centrifugação, e IL-17A foi analisado com um kit ELISA (R&D systems).

Análises estatísticas

[237] As análises estatísticas foram realizadas com o PRISM (GraphPad Software). Todos os dados sobre a concentração de IL-17A foram analisados usando o teste U de Mann-Whitney. As concentrações médias geométricas de IL-17A foram calculadas para cada grupo.

Resultados e Discussão:

Respostas de IL-17A após imunização intranasal com uma mistura de proteínas SP1500, SP0785 e Rhavi, ou com CP1 ou SP0785-ligante (SSSGG)-SP1500-ligante (SSVDKL)-PdT.

[238] Como visto na Figura 8, a imunização intranasal com CP1 com adjuvante CT induziu uma resposta Th17 específica ao antígeno mais forte em comparação com a imunização com SP0785 ou SP1500 adjuvado com CT, ou apenas com CT (controle). A resposta Th17 é indicada pelo aumento da produção de IL-17A após estimulação *ex vivo* do sangue periférico de camundongos imunizados com SP0785 purificado (Painel A), SP1500 purificado (Painel B) ou células inteiras pneumocócicas mortas (inativadas) (WCV; Painel C) .

[239] Como visto na Figura 9, a imunização intranasal com CP1

adjuvado com CT também induziu uma resposta Th17 específica de antígeno mais forte em comparação com a imunização com proteína de fusão SP0785-ligante (SSSGG)-SP1500-ligante (SSVDKL)-PdT adjuvado com CT ou com CT sozinho (controle). A resposta Th17 é indicada pelo aumento da produção de IL-17A após estimulação *ex vivo* de sangue periférico de camundongos imunizados com SP0785 purificado (Painel A) ou SP1500 purificado (Painel B).

[240] Como visto na Figura 10, a imunização intranasal com CP1 com adjuvante CT induziu uma resposta Th17 específica ao antígeno mais forte em comparação com a imunização com uma combinação (mistura) de SP0785, SP1500 e Rhavi adjuvado com CT, ou apenas com CT (controle). A resposta Th17 é indicada pelo aumento da produção de IL-17A após estimulação *ex vivo* do sangue periférico de camundongos imunizados com SP0785 purificado (Painel A), SP1500 purificado (Painel B) ou células inteiras pneumocócicas mortas (inativadas) (WCV; Painel C).

Exemplo 4: Comparação da atividade hemolítica de CP1 e SP0785-ligante (SSSGG)-SP1500-ligante (SSVDKL)-PdT

Materiais e métodos:

Produção de proteína recombinante

[241] As proteínas de fusão recombinantes marcadas com histidina CP1 e SP0785-ligante (SSSGG)-SP1500-ligante (SSVDKL)-PdT foram expressas em *Escherichia coli* e purificadas usando cromatografia de afinidade com ácido Ni-nitrilotriacético. Uma segunda purificação foi executada com cromatografia de exclusão de tamanho com uma coluna Superdex 200. A concentração de proteína foi medida usando um kit de ensaio de proteína de ácido bicinconínico (BCA) (Bio-Rad).

Ensaio de atividade hemolítica de proteínas de fusão

[242] O ensaio foi adaptado de Benton *et al*, 1997. O tampão de

ensaio continha 10 mM de ditiotreitol, 0,1% de albumina de soro bovino em PBS pH 7,4 e 2% de glóbulos vermelhos de ovelha. Os glóbulos vermelhos de ovelha foram preparados como se segue: adicionar 200 μl de sangue de ovelha + 1 ml de PBS pH 7,4, misturar bem, peletizar e lavar 3x a 8.000 rpm durante 30 segundos cada; finalmente ressuspender as células sanguíneas em 10 ml de PBS resfriado e manter no gelo até o uso. O ensaio foi realizado diluindo um padrão de pneumolisina (Ply), pneumolisoide PdT e proteínas de fusão para testar (CP1 e SP0785-ligante (SSSGG)-SP1500-ligante (SSVDKL)-PdT) nas concentrações indicadas na placa com 100 µl / poço, adicionando então 50 μl de glóbulos vermelhos de ovelha a 2% a todos os poços. A placa foi incubada durante 30 min a 37°C. Após a incubação, a placa foi centrifugada durante 5 min a 2.000 rpm à temperatura ambiente e 100 μl de sobrenadante foram transferidos para uma placa de 96 poços vazia para medir a absorbância a OD_{420}. [Benton, K.A., J.C. Paton, and D.E. Briles. 1997. As diferenças na virulência para camundongos entre as cepas de *Streptococcus pneumoniae* dos tipos capsulares 2, 3, 4, 5 e 6 não são atribuíveis a diferenças na produção de pneumolisina. Infect Immun. 65:1237-44]

Resultados e Discussão:

[243] Como visto na Figura 11, a incubação de glóbulos vermelhos de ovelha com a proteína de fusão CP1 não resultou em hemólise em nenhuma concentração testada. A incubação com proteína de fusão SP0785-ligante (SSSGG)-SP1500-ligante (SSVDKL)-PdT ou PdT pneumolisoide sozinho, em concentrações acima de 1 mg / ml e 0,5 mg / ml, respectivamente, resultou em hemólise quase completa dos glóbulos vermelhos de ovelha. Estes resultados mostram que as frações SP0785 e SP1500 das duas proteínas de fusão não contribuem para a atividade hemolítica. A atividade hemolítica da proteína de fusão SP0785-ligante (SSSGG)-SP1500-ligante (SSVDKL)-PdT é atribuível,

em vez disso, ao pneumolisoide PdT.

Sequências

[244] SEQ ID NO: 1, proteína rizavidina, comprimento total [aminoácidos 1-179]:

MIITSLYATFGTIADGRRTSGGKTMIRTNAVAALVFAVATSALAFDASN
FKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRAQGTGCQ
NSPYPLTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATGWTGYAQVNGNNT
EIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKSLLKD

[245] SEQ ID NO: 2, proteína rizavidina truncada, denotada Rhavi [aminoácidos 45-179]:

FDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRAQ
GTGCQNSPYPLTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATGWTGYAQV
NGNNTEIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKSLLKD

[246] SEQ ID NO: 3, proteína SP0785, comprimento total [aminoácidos 1-399], cepa TIGR4:

MKKKNGKAKKWQLYAAIGAASVVVLGAGGILLFRQPSQTALKDEPTH
LVV
AKEGSVASSVLLSGTVTAKNEQYVYFDASKGDLDEILVSVGDKVSEG
QAL
VKYSSSEAQAAYDSASRAVARADRHINELNQARNEAASAPAPQLPA
PVGG
EDATVQSPTPVAGNSVASIDAQLGDARDARADAAAQLSKAQSQLDA
TTVL
STLEGTVVEVNSNVSKSPTGASQVMVHIVSNENLQVKGELSEYNLAN
LSV
GQEVSFTSKVYPDKKWTGKLSYISDYPKNNGEAASPAAGNNTGSKY
PYTI
DVTGEVGDLKQGFSVNIEVKSKTKAILVPVSSLVMDDSKNYVWIVDE
QQK
AKKVEVSLGNADAENQEITSGLTNGAKVISNPTSSLEEGKEVKADEAT

N

[247] SEQ ID NO: 4, proteína SP0785 sem sequência de sinal [aminoácidos 33-399]:

Nota: Uma incompatibilidade T394A com SP0785 NCBI Sequências ABJ54007.1 e YP816180

FRQPSQTALKDEPTHLVVAKEGSVASSVLLSGTVTAKNEQYVYFDAS
KGDLDEILVSVGDKVSEGQALVKYSSSEAQAAYDSASRAVARADRHI
NELNQARNEAASAPAPQLPAPVGGEDATVQSPTPVAGNSVASIDAQ
LGDARDARADAAAQLSKAQSQLDATTVLSTLEGTVVEVNSNVSKSPT
GASQVMVHIVSNENLQVKGELSEYNLANLSVGQEVSFTSKVYPDKK
WTGKLSYISDYPKNNGEAASPAAGNNTGSKYPYTIDVTGEVGDLKQ
GFSVNIEVKSKTKAILVPVSSLVMDDSKNYVWIVDEQQKAKKVEVSLG
NADAENQEITSGLTNGAKVISNPTSSLEEGKEVKADEATN

[248] SEQ ID NO: 5, proteína de consenso SP0785 [aminoácidos 1-399]:

WP_081570978 1
MKKKNGKAKKWQLYAAIGAASVVVLGAGGILLFRQPSQTALKDEPTH
LVVAKEGSVASSVLLSGTVTAKNEQYVYFDASK 80

WP_054387396 1
MKKKNGKAKKWQLYAAIGAASVVVLGAGGILLFRQPSQTALKDEPTH
LIVAKEGSVASSVLLSGTVTAKNEQYVYFDASK 80

WP_097557828 1
MKKKNGKAKKWQLYAAIGAASVVVLGAGGILLFRQPSQTALKDEPTH
LVVAKEGSVASSVLLSGTVTAKNEQYVYFDASK 80

WP_000728643 1
MKKKNGKAKKWQLYAAIGAASVVVLGAGGILLFRQPSQTALKDEPTH
LVVAKEGSVASSVLLSGTVTAKNEQYVYFDASK 80

WP_061633543 1
MKKKNGKAKKWQLYAAIGAASVVVLGAGGILLFRQPSQTALKDEPTH
LVVAKEGSVASSVLLSGTVTAKNEQYVYFDASK 80

WP_050965059 1
MKKKNGKAKKWQLYAAIGAASVVVLGAGGILLFRQPSQTALKDEPTH
FVVAKEGSVASSVLLSGTVTAKNEQYVYFDASK 80
WP_055387306 1
MKKKNGKAKKWQLYAAIGAASVVVLGAGGILLFRQPSQTALKDEPTH
LVVAKEGSVASSVLLSGTVTAKNEQYVYFDASK 80
WP_050203943 1
MKKKNGKAKKWQLYAAIGAASVVVLGAGGILLFRQPSQTALKDEPTH
LVVAKEGSVASSVLLSGTVTAKNEQYVYFDASK 80
WP_000728633 1
MKKKNGKAKKWQLYAAIGAASVVVLGAGGILLFRQPSQTALKDEPIH
LVVAKEGSVASSVLLSGTVTAKNEQYVYFDASK 80
WP_088799985 1
MKKKNGKAKKWQLYAAIGAASVVVLGAGGILLFRQPSQTALKDEPTH
LVVAKEGSVASSVLLSGTVTAKNEQYVYFDASK 80
WP_061764363 1
MKKKNGKAKKWQLYAAIGAASVVVLGAGGILLFRQPSQTALKDEPTH
LVVAKEGSVASSVLLSGTVTAKNEQYVYFDASK 80
WP_050259582 1
MKKKNGKAKKWQLYAAIGAASVVVLGAGGILLFRQPSQTALKDEPTH
LVVAKEGSVASSVLLSGTVTAKNEQYVYFDASK 80
WP_023396621 1
MKKKNGKAKKWQLYAAIGAASVVILGAGGILLFRQPSQTALKDEPIHL
VVAKEGSVASSVLLSGTVTAKNEQYVYFDASK 80
WP_000728632 1
MKKKNGKAKKWQLYAAIGAASVVVLGAGGILLFRQPSQTALKDELTH
LVVAKEGSVASSVLLSGTVTAKNEQYVYFDASK 80
WP_061366281 1
MKKKNGKAKKWQLYAAIGAASVVVLGAGGILLFRQPSQTALKDEPTH
LVVAKEGSVASSVLLSGTVTAKNEQYVYFDASK 80

WP_061743315 1
MKKKNGKAKKWQLYAAIGAASVVVLGAGGILLFRQPSQTALKDEPTH
LVVAKEGSVASSVLLSGTVTAKNEQYVYFDASK 80
WP_057525500 1
MKKKNGKAKKWQLYAAIGAASVVVLGAGGILLFRQPSQTALKDEPIH
LVVAKEGSVASSVLLSGTVTAKNEQYVYFDASK 80
WP_000728639 1
MKKKNGKAKKWQLYAAIGAASVVVLGAGGILLFRQPSQTALKDEPTH
LVVAKEGSVASSVLLSGTVTAKNEQYVYFDASK 80
WP_084572368 1
MKKKNGKAKKWQLYAAIGAASVVVLGAGGILLFRQPSQTALKDEPTH
LVVAKEGSVASSVLLSGTVTAKNEQYVYFDASK 80
WP_084354434 1
MKKKNGKAKKWQLYAAIGAASVVVLGAGGILLFRQPYQTALKDEPTH
LVVVKEGSVASSVLLSGTVTAKNEQYVYFDASK 80
WP_050214972 1
MKKKNGKAKKWQLYAAIGAASVVVLGAGGILLFRQPSQTAVKDEPTH
LVVAKEGSVASSVLLSGTVTAKNEQYVYFDASK 80
WP_050208881 1
MKKKNGKAKKWQLYAAIGAASVVILGAGGILLFRQPSQTALKDEPIHL
VVAKEGSVASSVLLSGTVTAKNEQYVYFDASK 80
WP_088793209 1
MKKKNGKAKKWQLYAAIGAASVVVLGAGGILLFRQPSQTALKDEPTH
LVVAKEGSVASSVLLSGTVTAKNEQYVYFDASK 80
WP_069123032 1
MKKKNGKAKKWQLYAAIGAASVVVLGAGGILLFRQPSQTALKDEPTH
LVVAKEGSVASSILLSGTVTAKNEQYVYFDASK 80
WP_000728647 1
MKKKNGKAKKWQLYAAIGAASVVVLGAGGILLFRQPSQTALKDEPTH
LVVANEGSVASSVLLSGTVTAKNEQYVYFDASK 80

WP_081570978 81
GDLDEILVSVGDKVSEGQALVKYSSSEAQAAYDSASRAVARADRHIN
ELNQARNEAASAPAPQLPAPVGGEDATVQSPTP 160
WP_054387396 81
GDLDEILVSVGDKVSEGQALVKYSSSEAQAAYDSASRAVARADRHIN
ELNQARNEAASAPAPQLPAPVGGEDATVQSPTP 160
WP_097557828 81
GDLDEILVSVGDKVSEGQALVKYSSSEAQAAYDSASRAVARADRHIN
ELNQARNEAASAPAPQLPAPVGGEDATVQNPTP 160
WP_000728643 81
GDLDEILVSVGDKVSEGQALVKYSSSEAQAAYDSASRAVARADRHIN
ELNQARNEAASAPAPQLPAPVGGEDATVQSPTP 160
WP_061633543 81
GDLDEILVSVGDKVSEGQALVKYSSSEAQAAYDSASRAVARADRHIN
ELNQARNEAASAPTPQLPAPVGGEDATVQSPTP 160
WP_050965059 81
GDLDEILVSVGDKVSEGQALVKYSSSEAQAAYDSASRAVARADRHIN
ELNQARNEAASAPAPQLPAPVGGEDATVQSPTP 160
WP_055387306 81
GDLDEILVSVGDKVSEGQALVKYSSSEAQAAYDSASRAVARADRHIN
ELNQARNEAASAPAPQLPAPVGGEDATVQSPTP 160
WP_050203943 81
GDLDEILVSVGDKVSEGQALVKYSSSEAQAAYDSASRAVARADRHIN
ELNQARNEAASAPAPQLPAPVGGEDATVQSPTP 160
WP_000728633 81
GDLDEILVSVGDKVSEGQALVKYSSSEAQAAYDSASRAVARADRHIN
ELNQARNEAASAPAPQLPAPVGGEDATVQSPTP 160
WP_088799985 81
GDLDEILVSVGDKVSEGQALVKYSSSEAQAAYDSASRAVARADRHIN
ELNQARNEAASAPAPQLPAPVGGEDATVQSPTP 160

WP_061764363 81
GDLDEILVSVGDKVSEGQALVKYSSSEAQAAYDSASRAVARADRHIN
ELNQARNEAASALAPQLPAPVGGEDATVQSPTP 160
WP_050259582 81
GDLDEILVSVGDKVSEGQALVKYSSSEAQAAYDSASRAVARADRHIN
ELNQARNEAASAPAPQLPAPVGGEDATVPSPTP 160
WP_023396621 81
GDLDEILVSVGDKVSEGQALVKYSSSEAQAAYDSASRAVARADRHIN
ELNQARNEAASAPAPQLPAPVGGEDATVQSPTP 160
WP_000728632 81
GDLDEILVSVGDKVSEGQALVKYSSSEAQAAYDSASRAVARADRHIN
ELNQARNEAASAPAPQLPAPVGGEDATVQSPTP 160
WP_061366281 81
GDLDEILVSVGDKVSEGQALVKYSSSEAQAAYDSASRAVARADRHIN
ELNQARNEAASAPAPQLPAPVGGEDATVQSPTP 160
WP_061743315 81
GDLDEILVSVGDKVSEGQALVKYSSSEAQAAYDSASRAVAKADRHIN
ELNQARNEAASAPAPQLPAPVGGEDATVQSPTP 160
WP_057525500 81
GDLDEILVSVGDKVSEGQALVKYSSSEAQAAYDSASRAVARADRHIN
ELNQARNEAASAPAPQLPAPVGGEDATVQSPTP 160
WP_000728639 81
GDLDEILVSVGDKVSEGQALVKYSSSEAQAAYDSASRAVAKADRHIN
ELNQARNEAASAQAPQLPAPVGGEDATVQSPTP 160
WP_084572368 81
GDLDEILVSVGDKVSEGQALVKYSSSEAQAAYDSASRAVARVDCHIN
ELNQARNEAASAPAPQLPAPVGGEDATVQSPTP 160
WP_084354434 81
GDLDEILVSVGDKVSEGQALVKYSSSEAQAAYDSASRAVARADRHIN
ELNQARNEAASAPAPQLPAPVGGEDATVQSPTP 160

WP_050214972 81
GDLDEILVSVGDKVSEGQALVKYSSSEAQAAYDSASRAVAKADRHIN
ELNQARNEAASAPAPQLPAPVGGEDATVQSPTP 160
WP_050208881 81
GDLDEILVSVGDKVSEGQALVKYSSSEAQAAYDSASRAVAKADRHIN
ELNQARNEAASAPAPQLPAPVGGEDATVQSPTP 160
WP_088793209 81
GDLDEILVSVGDKVSEGQALVKYSSSEAQAVYDSASRAVAKADRHIN
ELNQARNEAASAPAPQLPAPVGGEDATVQSPTP 160
WP_069123032 81
GDLDEILVSVGDKVSEGQALVKYSSSEAQAAYDSASRAVAKADRHIN
ELNQVRNEAASAPAPQLPAPVGGEDATVQSPTP 160
WP_000728647 81
GDLDEILVSVGDKVSEGQALVKYSSSEAQAAYDSASRAVAKADRHIN
ELNQARNEAASAQAPQLPAPVGGEDATVQSPTP 160
WP_081570978 161
VAGNSVASIDAQLGDARDARADAAAQLSKAQSQLDATTVLSTLEGTV
VEVNSNVSKSPTGASQVMVHIVSNENLQVKGEL 240
WP_054387396 161
VAGNSVASIDAQLGDARDARADAAAQLSKAQSQLDATTVLSTLEGTV
VEVNSNVSKSPTGASQVMVHIVSNENLQVKGEL 240
WP_097557828 161
VAGNSVASIDAQLGDARDARADAAAQLSKAQSQLDATTVLSTLEGTV
VEVNSNVSKSPTGASQVMVHIVSNENLQVKGEL 240
WP_000728643 161
VAGNSVASIDAQLGDARDARADAAAQLSKAQSQLDATTVLSTLEGTV
VEVNSNVSKSPTGASQVMVHIVSNENLQVKGEL 240
WP_061633543 161
VAGNSVASIDAQLGDARDARADAAAQLSKAQSQLDATTVLSTLEGTV
VEVNSNVSKSPTGASQVMVHIVSNENLQVKGEL 240

WP_050965059 161
VAGNSVASIDAQLGDARDARADAAAQLSKAQSQLDATTVLSTLEGTV
VEVNSNVSKSPTGASQVMVHIVSNENLQVKGEL 240
WP_055387306 161
VAGNSVASIDAQLGDARDARADAAAQLSKAQSQLDATTVLSTLEGTV
VEVNSNVSKSPTGASQVMVHIVSNENLQVKGEL 240
WP_050203943 161
VAGNSVASIDAQLGDARDARADAAAQLSKAQSQLDATTVLSTLEGTV
VEVNSNVSKSPTGASQVMVHIVSNENLQVKGEL 240
WP_000728633 161
VAGNSVASIDAQLGDARDARADAAAQLSKAQSQLDATTVLSTLEGTV
VEVNSNVSKSPTGASQVMVHIVSNENLQVKGEL 240
WP_088799985 161
VAGNSVASIDAQLGDARDARADAAAQLSKAQSQLDATTVLSTLEGTV
VEVNSNVSKSPTGASQVMVHIVSNENLQVKGEL 240
WP_061764363 161
VAGNSVASIDAQLGDARDARADAAAQLSKAQSQLDATTVLSTLEGTV
VEVNSNVSKSPTGASQVMVHIVSNENLQVKGEL 240
WP_050259582 161
VAGNSVASIDAQLGDARDARADAAAQLSKAQSQLDATTVLSTLEGTV
VEVNSNVSKSPTGASQVMVHIVSNENLQVKGEL 240
WP_023396621 161
VAGNSVASIDAQLGDARDARADAAAQLSKAQSQLDATTVLSTLEGTV
VEVNSNVSKSPTGASQVMVHIVSNENLQVKGEL 240
WP_000728632 161
VAGNSVASIDAQLGDARDARADAAAQLSKAQSQLDATTVLSTLEGTV
VEVNSNVSKSPTGASQVMVHIVSNENLQVKGEL 240
WP_061366281 161
VAGNSVASIDAQLGDARDARADAAAQLSKAQSQLDATTVLSTLEGTV
VEVNSNVSKSPTGASQVMVHIVSNENLQVKGEL 240

WP_061743315 161
VAGNSVASIDAQLGDARDARADAAAQLSKAQSQLDATTVLSTLEGTV
VEVNSNVSKSPTGASQVMVHIVSNENLQVKGEL 240
WP_057525500 161
VAGNSVASIDAQLGDARDARADAAAQLSKAQSQLDATTVLSTLEGTV
VEVNSNVSKSPTGASQVMVHIVSNENLQVKGEL 240
WP_000728639 161
VAGNSVASIDAQLGDARDARADAAAQLSKAQSQLDATTVLSTLEGTV
VEVNSNVSKSPTGASQVMVHIVSNENLQVKGEL 240
WP_084572368 161
VAGNSVASIDAQLGDARDARADAAAQLSKAQSQLDATTVLSTLEGTV
VEVNSNVSKSPTGASQVMVHIVSNENLQVKGEL 240
WP_084354434 161
VAGNSVASIDAQLGDARDARADAAAQLSKAQSQLDATTVLSTLEGTV
VEVNSNVSKSPTGASQVMVHIVSNENLQVKGEL 240
WP_050214972 161
VAGNSVASIDAQLGDARDARADAAAQLSKAQSQLDATTVLSTLEGTV
VEVNSNVSKSPTGASQVMVHIVSNENLQVKGEL 240
WP_050208881 161
VAGNSVASIDAQLGDARDARADAAAQLSKAQSQLDATTVLSTLEGTV
VEVNSNVSKSPTGASQVMVHIVSNENLQVKGEL 240
WP_088793209 161
VAGNSVASIDAQLGDARDARADAAAQLSKAQSQLDATTVLSTLEGTV
VEVNSNVSKSPTGASQVMVHIVSNENLQVKGEL 240
WP_069123032 161
VAGNSVASIDAQLGDARDARADAAAQLSKAQSQLDATTVLSTLEGTV
VEVNSNVSKSPTGASQVMVHIVSNENLQVKGEL 240
WP_000728647 161
VAGNSVASIDAQLGDARDARADAAAQLSKAQSQLDATTVLSTLEGTV
VEVNSNVSKSPTGASQVMVHIVSNENLQVKGEL 240

WP_081570978 241
SEYNLANLSVGQEVSFTSKVYPDKKWTGKLSYISDYPKNNGEAASPA
AGNNTGSKYPYTIDVTGEVGDLKQGFSVNIEVK 320
WP_054387396 241
SEYNLANLSVGQEVSFTSKVYPDKKWTGKLSYISDYPKNNGEAASPA
AGNNTGSKYPYTIDVTGEVGDLKQGFSVNIEVK 320
WP_097557828 241
SEYNLANLSVGQEVSFTSKVYPDKKWTGKLSYISDYPKNNGEAASPA
AGNNTGSKYPYTIDVTGEVGDLKQGFSVNIEVK 320
WP_000728643 241
SEYNLANLSVGQEVSFTSKVYPDKKWTGKLSYISDYPKNNGEAASPA
AGNNTGSKYPYTIDVTGEVGDLKQGFSVNIEVK 320
WP_061633543 241
SEYNLANLSVGQEVSFTSKVYPDKKWTGKLSYISDYPKNNGEAASPA
AGNNTGSKYPYTIDVTGEVGDLKQGFSVNIEVK 320
WP_050965059 241
SEYNLANLSVGQEVSFTSKVYPDKKWTGKLSYISDYPKNNGEAASPA
AGNNTGSKYPYTIDVTGEVGDLKQGFSVNIEVK 320
WP_055387306 241
SEYNLANLSVGQEVSFTSKVYPDKKWTGKLSYISDYPKNNGEAASPA
AGNNTGSKYPYTIDVTGEVGDLKQGFSVNIEVK 320
WP_050203943 241
SEYNLANLSVGQEVSFTSKVYPDKKWTGKLSYISDYPKNNGAAASPA
AGNNTGSKYPYTIDVTGEVGDLKQGFSVNIEVK 320
WP_000728633 241
SEYNLANLSVGQEVSFTSKVYPDKKWTGKLSYISDYPKNNGEAASPA
AGNNTGSKYPYTIDVTGEVGDLKQGFSVNIEVK 320
WP_088799985 241
SEYNLANLSVGQEVSFTSKVYPDKKWTGKLSYISDYPKNNGEAASPA
AGNNTGSKYPYTIDVTGEGGDLKQGFSVNIEVK 320

WP_061764363 241
SEYNLANLSVGQEVSFTSKVYPDKKWTGKLSYISDYPKNNGEAASPA
AGNNTGSKYPYTIDVTGEVGDLKQGFSVNIEVK 320
WP_050259582 241
SEYNLANLSVGQEVSFTSKVYPDKKWTGKLSYISDYPKNNGEAASPA
AGNNTGSKYPYTIDVTGEVGDLKQGFSVNIEVK 320
WP_023396621 241
SEYNLANLSVGQEVSFTSKVYPDKKWTGKLSYISDYPKNNGEAASPA
AGNNTGSKYPYTIDVTGEVGDLKQGFSVNIEVK 320
WP_000728632 241
SEYNLANLSVGQEVSFTSKVYPDKKWTGKLSYISDYPKNNGEAASPA
AGNNTGSKYPYTIDVTGEVGDLKQGFSVNIEVK 320
WP_061366281 241
SEYNLANLSVGQEVSFTSKVYPDKKWTGKLSYISDYPKNNGEAASPA
SGNNTGSKYPYTIDVTGEIGDLKQGFSVNIEVK 320
WP_061743315 241
SEYNLANLSVGQEVSFTSKVYPDKKWTGRLSYISDYPKNNGEAASPA
AGNNTGSKYPYTIDVTGEVGDLKQGFSVNIEVK 320
WP_057525500 241
SEYNLANLSVGQEVSFTSKVYPDKKWTGKLSYISDYPKNNGEAASPA
SGNNTGSKYPYTIDVTGEIGDLKQGFSVNIEVK 320
WP_000728639 241
SEYNLANLSVGQEVSFTSKVYPDKKWTGKLSYISDYPKNNGEAASPA
AGNNTGSKYPYTIDVTGEVGDLKQGFSVNIEVK 320
WP_084572368 241
SEYNLANLSVGQEVSFTSKVYPDKKWTGKLSYISDYPKNNGEAASPA
AGNNTGSKYPYTIDVTGEVGDLKQGFSVNIEVK 320
WP_084354434 241
SEYNLANLSVGQEVSFTSKVYPDKKWTGKLSYISDYPKNNGEAASPA
AGNNTGSKYPYTIDVTGEVGDLKQGFSVNIEVK 320

WP_050214972 241
SEYNLANLSVGQEVSFTSKVYPDKKWTGKLSYISDYPKNNGEAASPA
AGNNTGSKYPYTIDVTGEVGNLKQGFSVNIEVK 320
WP_050208881 241
SEYNLANLSVGQEVSFTSKVYPDKKWTGKLSYISDYPKNNGEAASPA
AGNNTGSKYPYTIDVTGEVGDLKQGFSVNIEVK 320
WP_088793209 241
SEYNLANLSVGQEVSFTSKVYPDKKWTGKLSYISDYPKNNGEAASPA
AGNNTGSKYPYTIDVTGEVGDLKQGFSVNIEVK 320
WP_069123032 241
SEYNLANLSVGQEVSFTSKVYPDKKWTGKLSYISDYPKNNGEAASPA
AGNNTGSKYPYTIDVTGEVGDLKQGFSVNIEVK 320
WP_000728647 241
SEYNLANLSVGQEVSFTSKVYPDKKWTGKLSYISDYPKNNGEAASPA
AGNNTGSKYPYTIDVTGEVGDLKQGFSVNIEVK 320
WP_081570978 321
SKTKAILVPVSSLVMDNSKNYVWIVDEQQKAKKVEVSLGNADAENQE
ITSGLTNGAKVISNPTSSLEEGKEVKADEATN 399
WP_054387396 321
SKTKAILVPVSSLVMDDSKNYVWIVDEQQKAKKVEVSLGNADAENQE
ITSGLTNGAKVISNPTSSLEEGKEVKADEATN 399
WP_097557828 321
SKTKAILVPVSSLVMDDSKNYVWIVDEQQKAKKVEVSLGNADAENQE
ITSGLTNGAKVISNPTSSLEEGKEVKADEATN 399
WP_000728643 321
SKTKAILVPVSSLVMDDSKNYVWIVDEQQKSKKVEVSLGNADAENQE
ITSGLTNGAKVISNPTSSLEEGKEVKADEATN 399
WP_061633543 321
SKTKAILVPVSSLVMDDSKNYVWIVDEQQKAKKVEVSLGNADAENQE
ITSGLTNGAKVISNPTSSLEEGKEVKADEATN 399

WP_050965059 321
SKTKAILVPVSSLVMDDSKNYVWIVDEQQKAKKVEVSLGNADAENQE
ITSGLTNGAKVISNPTSSLEEGKEVKADEATN 399
WP_055387306 321
SKTKAILVPVSSLVMDDSKNYVWIVDEQQKAKKVEVSLGNADAENQE
ITSGLTNGAKVISNPTFSLEEGKEVKADEATN 399
WP_050203943 321
SKTKAILVPVSSLVMDDSKNYVWIVDEQQKAKKVEVSLGNADAENQE
ITSGLTNGAKVISNPTSSLEEGKEVKADEATN 399
WP_000728633 321
SKTKAILVPVSSLVMDDSKNYVWIVDEQQKAKKVEVSLGNADAENQE
ITSGLTNGAKVISNPTSSLEEGKEVKADEATN 399
WP_088799985 321
SKTKAILVPVSSLVMDDSKNYVWIVDEQQKAKKVEVSLGNADAENQE
ITSGLTNGAKVISNPTSSLEEGKEVKADEATN 399
WP_061764363 321
SKTKAILVPVSSLVMDDSKNYVWIVDEQQKAKKVEVSLGNADAENQE
ITSGLTNGAKVISNPTSSLEEGKEVKADEATN 399
WP_050259582 321
SKTKAILVPVSSLVMDDSKNYVWIVDEQQKAKKVEVSLGNADAENQE
ITSGLTNGAKVISNPTSSLEEGKEVKADEATN 399
WP_023396621 321
SKTKAILVPVSSLVMDDSKNYVWIVDEQQKAKKVEVSLGNADAENQE
ITSGLTNGAKVISNPTSSLEEGKEVKADEATN 399
WP_000728632 321
SKTKAILVPVSSLVMDDSKNYVWIVDEQQKAKKVEVSLGNADAENQE
ITSGLTNGAKVISNPTSSLEEGKEVKADEATN 399
WP_061366281 321
SKTKAILVPVSSLVMDDSKNYVWIVDEQQKAKKVEVSLGNADAENQE
ITSGLTNGAKVISNPTSSLEEGKEVKADEATN 399

WP_061743315 321
SKTKAILVPVSSLVMDDSKNYVWIVDEQQKAKKVEVSLGNADAENQE
ITSGLTNGAKVISNPTSSLEEGKEVKADEATN 399
WP_057525500 321
SKTKAILVPVSSLVMDDSKNYVWIVDEQQKAKKVEVSLGNADAENQE
ITSGLTNGAKVISNPTSSLEEGKEVKADEATN 399
WP_000728639 321
SKTKAILVPVSSLVMDDSKNYVWIVDEQQKAKKVEVSLGNADAENQE
ITSGLTNGAKVISNPTSSLEEGKEVKADEATN 399
WP_084572368 321
SKTKAILVPVSSLVMDDSKNYVWIVDEQQKAKKVEVSLGNADAENQE
ITSGLTNGAKVISNPTSSLEEGKEVKADEATN 399
WP_084354434 321
SKTKAILVPVSSLVMDDSKNYVWIVDEQQKAKKVEVSLGNADAENQE
ITSGLTNGAKVISNPTSSLEEGKEVKADEATN 399
WP_050214972 321
SKTKAILVPVSSLVMDDSKNYVWIVDEQQKAKKVEVSLGNADAENQE
ITSGLTNGAKVISNPTSSLEEGKEVKADEATN 399
WP_050208881 321
SKTKAILVPVSSLVMDDSKNYVWIVDEQQKAKKVEVSLGNADAENQE
ITSGLTNGAKVISNPTSSLEEGKEVKADEATN 399
WP_088793209 321
SKTKAILVPVSSLVMDDSKNYVWIVDEQQKAKKVEVSLGNADAENQE
ITSGLTNGAKVISNPTSSLEEGKEVKTDEATN 399
WP_069123032 321
SKTKAILVPVSSLVMDDSKNYVWIVDEQQKAKKVEVSLGNADAENQE
ITSGLTNGAKVISNPTSSLEEGKEVKADEATN 399
WP_000728647 321
SKTKAILVPVSSLVMDDSKNYVWIVDEQQKAKKVEVSLGNADAENQE
ITSGLTNGAKVISNPTSSLEEGKEVKADEATN 399

[249] SEQ ID NO: 6, proteína SP1500, comprimento total [aminoácidos 1-278], cepa TIGR4:

MKKWMLVLVSLMTALFLVACGKNSSETSGDNWSKYQSNKSITIGFDS
TFVPMGFAQKDGSYAGFDIDLATAVFEKYGITVNWQPIDWDLKEAEL
TKGTIDLIWNGYSATDERREKVAFSNSYMKNEQVLVTKKSSGITTAKD
MTGKTLGAQAGSSGYADFEANPEILKNIVANKEANQYQTFNEALIDLK
NDRIDGLLIDRVYANYYLEAEGVLNDYNVFTVGLETEAFAVGARKEDT
NLVKKINEAFSSLYKDGKFQEISQKWFGEDVATKEVKEGQ

[250] SEQ ID NO:7, proteína SP1500 sem sequência de sinal [aminoácidos 27-278]:

TSGDNWSKYQSNKSITIGFDSTFVPMGFAQKDGSYAGFDIDLATAVF
EKYGITVNWQPIDWDLKEAELTKGTIDLIWNGYSATDERREKVAFSN
SYMKNEQVLVTKKSSGITTAKDMTGKTLGAQAGSSGYADFEANPEIL
KNIVANKEANQYQTFNEALIDLKNDRIDGLLIDRVYANYYLEAEGVLND
YNVFTVGLETEAFAVGARKEDTNLVKKINEAFSSLYKDGKFQEISQK
WFGEDVATKEVKEGQ

[251] SEQ ID NO: 8, proteína de consenso SP1500 [aminoácidos 1-278]:

WP_000759187 1 --------
MKKWMLVLVSLMTALFLVACGKNSSETSGDNWSKYQSNKSITIGFDS
TFVPMGFAQKDGSYAGFDIDLATAV 72
WP_050213573 1 --------
MKKWMLVLVSLMTALFLVACGKNSSETSGDNWSKYQSNKSITIGFDS
TFVPMGFAQKDGSYAGFDIDLATAV 72
WP_061814735 1 --------
MKKWMLVLVSLMTALFLVACGKNSSETSGDNWSKYQSNKSITIGFDS
TFVPMGFAQKDGSYAGFDIDLATAV 72
WP_084843602 1 --------
MKKWMHVLVSLMTALFLVACGKNSSETSGDNWSKYQSNKSITIGFD
STFVPMGFAQKDGSYAGFDIDLATAV 72

WP_000759185 1 --------
MKKWMLVLVSLMTALFLVACGKNSSETSGDNWSKYQSNKSITIGFDS
TFVPMGFAQKDGSYAGFDIDLATAV 72
WP_050261378 1 --------
MKKWMLVLVSLMTALFLVACGKNTSETSGDNWSKYESNKSITIGFDS
TFVPMGFAQKDGSYAGFDIDLATAV 72
WP_050220771 1 --------
MKKWMLVLVSLMTALFLVACGKNSSETSGDNWSKYESNKSITIGFDS
TFVPMGFAQKDGSYAGFDIDLATAV 72
CKA82396 1 ----
mkkwMKKWMLVLVSLMTALFLVACGKNTSETSGDNWSKYESNKSITI
GFDSTFVPMGFAQKDGSYAGFDIDLATAV 76
WP_088802838 1 --------
MKKWMLVLVSLMTALFLVACGKNSSETSGDNWSKYQSNKSITIGFDS
TFVPMGFAQKDGSYAGFDIDLATAV 72
WP_049512265 1 --------
MKKWMLVLVSLMTALFLVACGKNSSETSGDNWSKYESNKSITIGFDS
TFVPMGFAQKDGSYAGFDIDLATAV 72
CKL85404 1 ----
mkkwMKKWMLVLVSLMTALFLVACGKNSSETSGDNWSKYQSNKSITI
GFDSTFVPMGFAQKDGSYAGFDIDLATAV 76
EHZ28755 1 ----------
MLVLVSLMTALFLVACGKNSSETSGDNWSKYQSNKSITIGFDSTFVP
MGFAQKDGSYAGFDIDLATAV 68
WP_100128002 1 --------
MKKWILVLVSLMTALFLVACGKNSSETSGDNWSKYESNKSITIGFDST
FVPMGFAQKDGSYAGFDIDLATAV 72
WP_053039665 1 --------
MKKWMLVLVSLMTALFLVACGKNSSETSGDNWSKYESNKSITIGFDS
TFVPMGFAQKDGSYAGFDIDLATAV 72

WP_101514844 1 --------
MKKWILVLVSLMTALFLVACGKNSSETSGDNWSKYESNKSITIGFDST
FVPMGFAQKDGSYAGFDIDLATAV 72
WP_050242061 1 --------
MKKWMLVLVSLMTALFLVACGKNASEISGDNWSKYQSNKSITIGFDS
TFVPMGFAQKDGSYAGFDIDLATAV 72
WP_023941000 1 --------
MKKWMFVLVSLMTALFLVACGKNASETSGDNWSKYESNKSITIGFDS
TFVPMGFAQKDGSYAGFDIDLATAV 72
EHE15463 1 ----------
MLVLVSLMTALFLVACGKNSSETSGDNWSKYQSNKSITIGFDSTFVP
MGFAQKDGSYAGFDIDLATAV 68
EHE34295 1 ----------
MLVLVSLMTALFLVACGKNSSETSGDNWSKYQSNKSITIGFDSTFVP
MGFAQKDGSYAGFDIDLATAV 68
CCM08008 1 --------
MKKWMLVLVSLMTALFLVACGKNSSETSGDNWSKYESNKSITIGFDS
TFVPMGFAQKDGSYAGFDIDLATAV 72
KGI27253 1 ----
mkkwMKKWMLVLVSLMTALFLVACGKNASETSGDNWSKYESNKSITI
GFDSTFVPMGFAQKDGSYAGFDIDLATAV 76
WP_088777969 1 --------
MKKWMLVLVSLMTALFLVACGKNASETSGDNWSKYESNKSITIGFDS
TFVPMGFAQKDGSYAGFDIDLATAV 72
WP_050223531 1 --------
MKKWMLVLVSLMIALFLVACGKNTSETSGDNWSKYESNKSITIGFDS
TFVPMGFAQKDGSYAGFDIDLATAV 72
CKJ33697 1
mkkwmkkwMKKWMLVLVSLMTALFLVACGKNASETSGDNWSKYESN
KSITIGFDSTFVPMGFAQKDGSYAGFDIDLATAV 80

WP_000759187 73
FEKYGITVNWQPIDWDLKEAELTKGTIDLIWNGYSATDERREKVAFSN
SYMKNEQVLVTKKSSGITTAKDMTGKTLGAQA 152
WP_050213573 73
FEKYGITVNWQPIDWDLKEAELTKGTIDLIWNGYSATDERREKVAFSN
SYMKNEQVLVTKKSSGITTAKDMTGKTLGAQA 152
WP_061814735 73
FEKYGITVNWQPIDWDLKEAELTKGTIDLIWNGYSATDERREKVAFSN
SYMKNEQVLVTKKSSGITTAKDMTGKTLGAQA 152
WP_084843602 73
FEKYGITVNWQPIDWDLKEAELTKGTIDLIWNGYSATDERREKVAFSN
SYMKNEQVLVTKKLSGITTAKDMTGKTLGAQA 152
WP_000759185 73
FEKYGITVNWQPIDWDLKEAELTKGTIDLIWNGYSATDERREKVAFSN
SYMKNEQVLVTKKLSGITTAKDMTGKTLGAQA 152
WP_050261378 73
FEKYGITVNWQPIDWDLKEAELTKGTIDLIWNGYSATDERREKVAFSN
SYMKNEQVLVTKKSSGITTAKDMAGKTLGAQA 152
WP_050220771 73
FEKYGITVNWQPIDWDLKEAELTKGTIDLIWNGYSATDERREKVAFSN
SYMKNEQVLVTKKSSGITTAKDMAGKTLGAQA 152
CKA82396 77
FEKYGITVNWQPIDWDLKEAELTKGTIDLIWNGYSATDERREKVAFSN
SYMKNEQVLVTKKSSGITTAKDMAGKTLGAQA 156
WP_088802838 73
FEKYGITVNWQPIDWDLKEAELTKGTIDLIWNGYSATDERREKVAFSN
SYMKNEQVLVTKKLSGITTAKDMTGKTLGAQA 152
WP_049512265 73
FEKYGITVNWQPIDWDLKEAELTKGTIDLIWNGYSATDERREKVAFSN
SYMKNEQVLVTKKSSGITTAKDMAGKTLGAQA 152

CKL85404 77
FEKYGITVNWQPIDWDLKEAELTKGTIDLIWNGYSATDERREKVAFSN
SYMKNEQVLVTKKLSGITTAKDMNGKTLGAQA 156
EHZ28755 69
FEKYGITVNWQPIDWDLKEAELTKGTIDLIWNGYSATDERREKVAFSN
SYMKNEQVLVTKKSSGITTAKDMTGKTLGAQA 148
WP_100128002 73
FEKYGITVNWQPIDWDLKEAELTKGTIDLIWNGYSATDERREKVAFSN
SYMKNEQVLVTKKSSGITTAKDMAGKTLGAQA 152
WP_053039665 73
FEKYGITVNWQPIDWDLKEAELTKGTIDLIWNGYSATYERREKVAFSN
SYMKNEQVLVTKKLSGITTAKDMTGKTLGAQA 152
WP_101514844 73
FEKYGITVNWQPIDWDLKEAELTKGTIDLIWNGYSATDERREKVAFSH
SYMKNEQVLVTKKSSGITTAKDMAGKTLGAQA 152
WP_050242061 73
FEKYGITVNWQPIDWDLKEAELTKGTIDLIWNGYSATDERREKVAFSN
SYMKNEQVLVTKKSSGITTAKDMAGKTLGAQA 152
WP_023941000 73
FEKYGITVNWQPIDWDLKEAELTKGTIDLIWNGYSATDERREKVAFSN
SYMKNEQVLVTKKSSGITTAKDMAGKTLGAQA 152
EHE15463 69
FEKYGITVNWQPIDWDLKEAELTKGTIDLIWNGYSATDERREKVAFSN
SYMKNEQVLVTKKSSGITTAKDMTGKTLGAQA 148
EHE34295 69
FEKYGITVNWQPIDWDLKEAELTKGTIDLIWNGYSATDERREKVAFSN
SYMKNEQVLVTKKSSGITTAKDMTGKTLGAQA 148
CCM08008 73
FEKYGITVNWQPIDWDLKEAELTKGTIDLIWNGYSATYERREKVAFSN
SYMKNEQVLVTKKLSGITTAKDMTGKTLGAQA 152

KGI27253 77
FEKYGITVNWQPIDWDLKEAELTKGTIDLIWNGYSATDERREKVAFSN
SYMKNEQVLVTKKLSGITTAKDMTGKILGAQA 156
WP_088777969 73
FEKYGITVNWQPIDWDLKEAELTKGTIDLIWNGYSATDERREKVAFSN
SYMKNEQVLVTKKSSGITTAKDMAGKTLGAQA 152
WP_050223531 73
FEKYGITINWQPIDWDLKEAELTKGTIDLIWNGYSATDERREKVAFSH
SYMKNEQVLVTKKSSGITTAKDMAGKTLGAQA 152
CKJ33697 81
FEKYGITVNWQPIDWDLKEAELTKGTIDLIWNGYSATDERREKVAFSN
SYMKNEQVLVTKKLSGITTAKDMTGKILGAQA 160
WP_000759187 153
GSSGYADFEANPEILKNIVANKEANQYQTFNEALIDLKNDRIDGLLIDR
VYANYYLEAEGVLNDYNVFTVGLETEAFAVG 232
WP_050213573 153
GSSGYADFEANPELLKNIVANKEVNQYQTFNEALIDLKNDRIDGLLIDR
VYANYYLEAEGVLNDYNVFTVGLETEAFAVG 232
WP_061814735 153
GSSGYADFEANPELLKNIVANKEANQYQTFNEALIDLKNDRIDGLLIDR
VYANYYLEAEGVLNDYNVFTVGLETEAFAVG 232
WP_084843602 153
GSSGYADFEANPELLKNIVANKEANQYQTFNEALIDLKNDRIDGLLIDR
VYANYYLEAEGVLNDYNVFTVGLETEAFAVG 232
WP_000759185 153
GSSGYADFEANPELLKNIVANKEANQYQTFNEALIDLKNDRIDGLLIDR
VYANYYLEAEGVLNDYNVFTVGLETEAFAVG 232
WP_050261378 153
GSSGYADFEANPELLKNIVANKEANQYQTFNEALIDLKNDRIDGLLIDR
VYANYYLEAEGVLNDYNVFTVGLETEAFAVG 232

WP_050220771 153
GSSGYADFEANPAILKDIVANKEANQYQTFNEALIDLKNDRIDGLLIDR
VYANYYLEAEGVLNDYNVFTVGLETEAFAVG 232
CKA82396 157
GSSGYADFEANPELLKNIVANKEANQYQTFNEALIDLKNDRIDGLLIDR
VYANYYLEAEGVLNDYNVFTVGLETEAFAVG 236
WP_088802838 153
GSSGYADFEANPELLKNIVANKEANQYQTFNEALIDLKNDRIDGLLIDR
VYANYYLEAEGVLNDYNVFTVGLETEAFAVG 232
WP_049512265 153
GSSGYADFEANPAILKDIVANKEANQYQTFNEALIDLKNDRIEGLLIDR
VYANYYLEAEGVLNDYNVFTVGLETEAFAVG 232
CKL85404 157
GSSGYADFEANPELLKNIVANKEANQYQTFNEALIDLKNDRIDGLLIDR
VYANYYLEAEGVLNDYNVFTVGLETEAFAVG 236
EHZ28755 149
GSSGYADFEANPEILKNIVANKEANQYQTFNEALIDLKNDRIDGLLIDR
VYANYYLEAEGVLNDYNVFTVGLETEAFAVG 228
WP_100128002 153
GSSGYADFEANPAILKDIVANKEANQYQTFNEALIDLKNDRIDGLLIDR
VYANYYLEAEGVLNDYNVFTVGLETEAFAVG 232
WP_053039665 153
GSSGYADFEANPEILKNIVANKEANQYQTFNEALIDLKNDRIDGLLIDR
VYANYYLEAEGVLNDYNVFTVGLETEAFAVG 232
WP_101514844 153
GSSGYADFEANPAILKDIVANKEANQYQTFNEALIDLKNDRIDGLLIDR
VYANYYLEAEGVLNDYNVFTVGLETEAFAVG 232
WP_050242061 153
GSSGYADFEANPAILKDIVANKEANQYQTFNEALIDLKNDRIDGLLIDR
VYANYYLEAEGVLNDYNVFTVGLETEAFAVG 232

WP_023941000 153
GSSGYADFEANPAILKDIVANKEANQYQTFNEALIDLKNDRIDGLLIDR
VYANYYLEAEGVLNDYNVFTVGLETEAFAVG 232
EHE15463 149
GSSGYADFEANPEILKNIVANKEANQYQTFNEALIDLKNDRIDGLLIDR
VYANYYLEAEGVLNDYNVFTVGLETEAFAVG 228
EHE34295 149
GSSGYADFEANPELLKNIVANKEANQYQTFNEALIDLKNDRIDGLLIDR
VYANYYLEAEGVLNDYNVFTVGLETEAFAVG 228
CCM08008 153
GSSGYADFEANPEILKNIVANKEANQYQTFNEALIDLKNDRIDGLLIDR
VYANYYLEAEGVLNDYNVFTVGLETEAFAVG 232
KGI27253 157
GSSGYADFEANPEILKNIVANKEANQYQTFNEALIDLKNDRIDGLLIDR
VYANYYLEAEGVLNDYNVFTVGLEIEAFAVG 236
WP_088777969 153
GSSGYADFEANPAILKDIVANKEANQYQIFNEALIDLKNDRIDGLLIDR
VYANYYLEAEGVLNDYNVFTVGLETEAFAVG 232
WP_050223531 153
GSSGYADFEANPAILKDIVANKEANQYQTFNEALIDLKNDRIDGLLIDR
VYANYYLEAEGVLNDYNVFTVGLETEAFAVG 232
CKJ33697 161
GSSGYADFEANPEILKNIVANKEANQYQTFNEALIDLKNDRIDGLLIDR
VYANYYLEAEGVLNDYNVFTVGLEIEAFAVG 240
WP_000759187 233
ARKEDTNLVKKINEAFSSLYKDGKFQEISQKWFGEDVATKEVKEGQ
278
WP_050213573 233
ARKEDTTLVKKINEAFSSLYKDGKFQEISQKWFGEDVATKEVKEGQ
278

WP_061814735 233
ARKEDTTLVKKINEDFSSLYKNGKFQEISQKWFGEDVATKEVKEGQ
278
WP_084843602 233
ARKEDTNLVKKINEAFSSLYKDGKFQEISQKWFGEDVATKEVKEGQ
278
WP_000759185 233
ARKEDTTLVKKINEAFSSLYKDGKFQEISQKWFGEDVATKEVKEGQ
278
WP_050261378 233
ARKEDTTLVKKINEAFSSLYKDGKFQEISQKWFGEDVATKEVKEGQ
278
WP_050220771 233
ARKEDTTLVKKINEAFSSLYKDGKFQEISQKWFGEDVATKEVKEGQ
278
CKA82396 237
ARKEDTTLVKKINEAFSSLYKDGKFQEISQKWFGEDVATKEVKEGQ
282
WP_088802838 233
ARKEDTTLVKKINEAFSSLYKDGKFQEISQKWFGEGVATKEVKEGQ
278
WP_049512265 233
ARKEDTTLVKKINEAFSSLYKDGKFQEISQKWFGEDVATKEVKEGQ
278
CKL85404 237
ARKEDTTLVKKINEAFSSLYKDGKFQEISQKWFGEDVATKEVKEGQ
282
EHZ28755 229
ARKEDTTLVKKINEAFSSLYKDGKFQEISQKWFGEDVATKEVKEGQ
274

WP_100128002 233
ARKEDTTLVKKINEAFSSLYKDGKFQEISQKWFGEDVATKEVKEGQ
278
WP_053039665 233
ARKEDTTLVKKINEAFSSLYKDGKFQEISQKWFGEDVATKEVKEGQ
278
WP_101514844 233
ARKEDTTLVKKINEAFSSLYKDGKFQEISQKWFGEDVATKEVKEGQ
278
WP_050242061 233
TRKEDTTLVKKINEAFSSLYKDGKFQEISQKWFGEDVATKEVKEGQ
278
WP_023941000 233
ARKEDTTLVKKINEAFSSLYKDGKFQEISQKWFGEDVATKEVKEGQ
278
EHE15463 229
SRKEDTTLVKKINEAFSSLYKDGKFQEISQKWFGEDVATKEVKEGQ
274
EHE34295 229
ARKEDTTLVKKINEAFSSLYKDGKFQEISQKWFGEDVATKEVKEGQ
274
CCM08008 233
ARKEDTTLVKKINEAFSSLYKDGKFQEISQKWFGEDVATKEVKEG-
277
KGI27253 237
ARKEDTTLVKKINEAFSSLYKDGKFQEISQKWFGEDVATKEVKEGQ
282
WP_088777969 233
ARKEDITLVKKINEAFSSLYKDGKFQEISQKWFGEDVATKEVKEGQ
278

WP_050223531 233
ARKEDTTLVKKINEAFSSLYKDGKFQEISQKWFGEDVATKEVKEGQ
278
CKJ33697 241
ARKEDTTLVKKINEAFSSLYKDGKFQEISQKWFGEDVATKEVKEGQ
286

[252] SEQ ID NO: 9, gene de rizavidina que codifica a proteína de rizavidina de comprimento completo:
TTGATTATTACGAGTTTATATGCAACCTTCGGTACGATCGCCGACG
GTCGGCGCACATCAGGAGGAAAAACCATGATCCGTACTAATGCAG
TTGCAGCACTTGTGTTTGCTGTAGCAACCTCAGCTCTTGCTTTCGA
TGCAAGCAACTTCAAGGATTTTTCAAGCATCGCATCGGCTTCCAG
CAGTTGGCAGAACCAGTCCGGCTCGACGATGATCATTCAAGTCGA
CTCGTTCGGAAATGTCTCCGGCCAATATGTAAACAGAGCCCAGGG
CACCGGATGCCAGAACTCGCCCTATCCGCTAACAGGAAGGGTAA
ACGGGACGTTCATCGCATTTTCGGTCGGCTGGAACAATTCGACGG
AGAACTGCAATTCCGCAACCGGATGGACCGGCTACGCACAGGTC
AACGGCAACAACACTGAGATAGTCACGAGCTGGAACCTCGCTTAC
GAAGGCGGCTCCGGTCCGGCCATTGAGCAAGGACAAGACACTTT
CCAGTACGTGCCGACGACTGAGAACAAAAGCCTCTTGAAGGATTA
A

[253] SEQ ID NO: 10, gene de rizavidina que codifica a proteína rizavidina truncada, denotado Rhavi [aminoácidos 45-179]:
TTTGATGCGAGTAACTTTAAAGATTTCAGCTCTATTGCGAGCGCCA
GTAGCTCTTGGCAGAATCAGAGTGGCAGCACCATGATTATCCAGG
TGGATTCTTTCGGCAACGTTAGTGGCCAGTATGTTAATCGTGCGC
AGGGCACGGGTTGCCAGAACTCTCCGTACCCGCTGACCGGCCGC
GTGAATGGCACGTTTATCGCCTTCAGCGTTGGCTGGAACAATTCT
ACCGAAAACTGTAATAGTGCAACCGGCTGGACGGGTTATGCGCA
GGTGAACGGTAACAATACCGAAATTGTTACGAGCTGGAATCTGGC

CTATGAAGGCGGTTCTGGCCCGGCAATCGAACAGGGTCAGGATA
CCTTTCAGTACGTTCCGACCACGGAAAACAAAAGCCTGCTGAAAG
AT

[254] SEQ ID NO: 11, gene SP0785 que codifica a proteína SP0785 de comprimento completo [aminoácidos 1-399], cepa TIGR4:

ATGAAGAAAAAGAATGGTAAAGCTAAAAAGTGGCAACTGTATGCA
GCAAT
CGGTGCTGCGAGTGTAGTTGTATTGGGTGCTGGGGGGATTTTACT
CTTTA
GACAACCTTCTCAGACTGCTCTAAAAGATGAGCCTACTCATCTTGT
TGTT
GCCAAGGAAGGAAGCGTGGCCTCCTCTGTTTTATTGTCAGGGACA
GTAAC
AGCAAAAAATGAACAATATGTTTATTTTGATGCTAGTAAGGGTGAT
TTAG
ATGAAATCCTTGTTTCTGTGGGCGATAAGGTCAGCGAAGGGCAGG
CTTTA
GTCAAGTACAGTAGTTCAGAAGCGCAGGCGGCCTATGATTCAGCT
AGTCG
AGCAGTAGCTAGGGCAGATCGTCATATCAATGAACTCAATCAAGC
ACGAA
ATGAAGCCGCTTCAGCTCCGGCTCCACAGTTACCAGCGCCAGTA
GGAGGA
GAAGATGCAACGGTGCAAAGCCCAACTCCAGTGGCTGGAAATTCT
GTTGC
TTCTATTGACGCTCAATTGGGTGATGCCCGTGATGCGCGTGCAGA
TGCTG
CGGCGCAATTAAGCAAGGCTCAAAGTCAATTGGATGCAACAACTG
TTCTC
AGTACCCTAGAGGGAACTGTGGTCGAAGTCAATAGCAATGTTTCT

AAATC
TCCAACAGGGGCGAGTCAAGTTATGGTTCATATTGTCAGCAATGA
AAATT
TACAAGTCAAGGGAGAATTGTCTGAGTACAATCTAGCCAACCTTTC
TGTA
GGTCAAGAAGTAAGCTTTACTTCTAAAGTGTATCCTGATAAAAAAT
GGAC
TGGGAAATTAAGCTATATTTCTGACTATCCTAAAAACAATGGTGAA
GCAG
CTAGTCCAGCAGCCGGGAATAATACAGGTTCTAAATACCCTTATAC
TATT
GATGTGACAGGCGAGGTTGGTGATTTGAAACAAGGTTTTTCTGTC
AACAT
TGAGGTTAAAAGCAAAACTAAGGCTATTCTTGTTCCTGTTAGCAGT
CTAG
TAATGGATGATAGTAAAAATTATGTCTGGATTGTGGATGAACAACA
AAAG
GCTAAAAAAGTTGAGGTTTCATTGGGAAATGCTGACGCAGAAAAT
CAAGA
AATCACTTCTGGTTTAACGAACGGTGCTAAGGTCATCAGTAATCCA
ACAT
CTTCCTTGGAAGAAGGAAAAGAGGTGAAGGCTGATGAAGCAACTA
AT

[255] SEQ ID NO: 12, gene SP0785 que codifica a proteína SP0785 sem sequência de sinal [aminoácidos 33-399]:

TTTAGACAACCTTCTCAGACTGCTCTAAAAGATGAGCCTACTCATC
TTGTTGTTGCCAAGGAAGGAAGCGTGGCCTCCTCTGTTTTATTGT
CAGGGACAGTAACAGCAAAAAATGAACAATATGTTTATTTTGATGC
TAGTAAGGGTGATTTAGATGAAATCCTTGTTTCTGTGGGCGATAAG
GTCAGCGAAGGGCAGGCTTTAGTCAAGTACAGTAGTTCAGAAGCG

CAGGCGGCCTATGATTCAGCTAGTCGAGCAGTAGCTAGGGCAGA
TCGTCATATCAATGAACTCAATCAAGCACGAAATGAAGCCGCTTCA
GCTCCGGCTCCACAGTTACCAGCGCCAGTAGGAGGAGAAGATGC
AACGGTGCAAAGCCCAACTCCAGTGGCTGGAAATTCTGTTGCTTC
TATTGACGCTCAATTGGGTGATGCCCGTGATGCGCGTGCAGATGC
TGCGGCGCAATTAAGCAAGGCTCAAAGTCAATTGGATGCAACAAC
TGTTCTCAGTACCCTAGAGGGAACTGTGGTCGAAGTCAATAGCAA
TGTTTCTAAATCTCCAACAGGGGCGAGTCAAGTTATGGTTCATATT
GTCAGCAATGAAAATTTACAAGTCAAGGGAGAATTGTCTGAGTACA
ATCTAGCCAACCTTTCTGTAGGTCAAGAAGTAAGCTTTACTTCTAA
AGTGTATCCTGATAAAAAATGGACTGGGAAATTAAGCTATATTTCT
GACTATCCTAAAAACAATGGTGAAGCAGCTAGTCCAGCAGCCGGG
AATAATACAGGTTCTAAATACCCTTATACTATTGATGTGACAGGCG
AGGTTGGTGATTTGAAACAAGGTTTTTCTGTCAACATTGAGGTTAA
AAGCAAAACTAAGGCTATTCTTGTTCCTGTTAGCAGTCTAGTAATG
GATGATAGTAAAAATTATGTCTGGATTGTGGATGAACAACAAAAGG
CTAAAAAAGTTGAGGTTTCATTGGGAAATGCTGACGCAGAAAATCA
AGAAATCACTTCTGGTTTAACGAACGGTGCTAAGGTCATCAGTAAT
CCAACATCTTCCTTGGAAGAAGGAAAAGAGGTGAAGGCTGATGAA
GCAACTAAT

[256] SEQ ID NO: 13, gene SP1500 que codifica a proteína SP1500 de comprimento completo [aminoácidos 1-278], cepa TIGR4:

ATGAAAAAATGGATGCTTGTATTAGTCAGTCTGATGACTGCTTTGT
TCTT

AGTAGCTTGTGGGAAAAATTCTAGCGAAACTAGTGGAGATAATTG
GTCAA

AGTACCAGTCTAACAAGTCTATTACTATTGGATTTGATAGTACTTTT
GTT

CCAATGGGATTTGCTCAGAAAGATGGTTCTTATGCAGGATTTGATA
TTGA

TTTAGCTACAGCTGTTTTTGAAAAATACGGAATCACGGTAAATTGG
CAAC
CGATTGATTGGGATTTGAAAGAAGCTGAATTGACAAAAGGAACGA
TTGAT
CTGATTTGGAATGGCTATTCCGCTACAGACGAACGCCGTGAAAAG
GTGGC
TTTCAGTAACTCATATATGAAGAATGAGCAGGTATTGGTTACGAAG
AAAT
CATCTGGTATCACGACTGCAAAGGATATGACTGGAAAGACATTAG
GAGCT
CAAGCTGGTTCATCTGGTTATGCGGACTTTGAAGCAAATCCAGAA
ATTTT
GAAGAATATTGTCGCTAATAAGGAAGCGAATCAATACCAAACCTTT
AATG
AAGCCTTGATTGATTTGAAAAACGATCGAATTGATGGTCTATTGAT
TGAC
CGTGTCTATGCAAACTATTATTTAGAAGCAGAAGGTGTTTTAAACG
ATTA
TAATGTCTTTACAGTTGGACTAGAAACAGAAGCTTTTGCGGTTGGA
GCCC
GTAAGGAAGATACAAACTTGGTTAAGAAGATAAATGAAGCTTTTTC
TAGT
CTTTACAAGGACGGCAAGTTCCAAGAAATCAGCCAAAAATGGTTT
GGAGA
AGATGTAGCAACCAAAGAAGTAAAAGAAGGACAG

[257] SEQ ID NO: 14, gene SP1500 que codifica a proteína SP1500 sem sequência de sinal [aminoácidos 27-278]:

ACTAGTGGAGATAATTGGTCAAAGTACCAGTCTAACAAGTCTATTA
CTATTGGATTTGATAGTACTTTTGTTCCAATGGGATTTGCTCAGAA
AGATGGTTCTTATGCAGGATTTGATATTGATTTAGCTACAGCTGTT

TTTGAAAAATACGGAATCACGGTAAATTGGCAACCGATTGATTGG
GATTTGAAAGAAGCTGAATTGACAAAAGGAACGATTGATCTGATTT
GGAATGGCTATTCCGCTACAGACGAACGCCGTGAAAAGGTGGCTT
TCAGTAACTCATATATGAAGAATGAGCAGGTATTGGTTACGAAGAA
ATCATCTGGTATCACGACTGCAAAGGATATGACTGGAAAGACATTA
GGAGCTCAAGCTGGTTCATCTGGTTATGCGGACTTTGAAGCAAAT
CCAGAAATTTTGAAGAATATTGTCGCTAATAAGGAAGCGAATCAAT
ACCAAACCTTTAATGAAGCCTTGATTGATTTGAAAAACGATCGAAT
TGATGGTCTATTGATTGACCGTGTCTATGCAAACTATTATTTAGAA
GCAGAAGGTGTTTTAAACGATTATAATGTCTTTACAGTTGGACTAG
AAACAGAAGCTTTTGCGGTTGGAGCCCGTAAGGAAGATACAAACT
TGGTTAAGAAGATAAATGAAGCTTTTTCTAGTCTTTACAAGGACGG
CAAGTTCCAAGAAATCAGCCAAAAATGGTTTGGAGAAGATGTAGC
AACCAAAGAAGTAAAAGAAGGACAG

[258] SEQ ID NO: 15, etiqueta His 1:

HHHHHH

[259] SEQ ID NO: 16, etiqueta His 2:

MSYYHHHHHH

[260] SEQ ID NO: 17, proteína de fusão SP1500-SP0785:

MTSGDNWSKYQSNKSITIGFDSTFVPMGFAQKDGSYAGFDIDLATAV
FEKYGITVNWQPIDWDLKEAELTKGTIDLIWNGYSATDERREKVAFSN
SYMKNEQVLVTKKSSGITTAKDMTGKTLGAQAGSSGYADFEANPEIL
KNIVANKEANQYQTFNEALIDLKNDRIDGLLIDRVYANYYLEAEGVLND
YNVFTVGLETEAFAVGARKEDTNLVKKINEAFSSLYKDGKFQEISQK
WFGEDVATKEVKEGQFRQPSQTALKDEPTHLVVAKEGSVASSVLLS
GTVTAKNEQYVYFDASKGDLDEILVSVGDKVSEGQALVKYSSSEAQA
AYDSASRAVARADRHINELNQARNEAASAPAPQLPAPVGGEDATVQ
SPTPVAGNSVASIDAQLGDARDARADAAAQLSKAQSQLDATTVLSTL
EGTVVEVNSNVSKSPTGASQVMVHIVSNENLQVKGELSEYNLANLSV
GQEVSFTSKVYPDKKWTGKLSYISDYPKNNGEAASPAAGNNTGSKY

PYTIDVTGEVGDLKQGFSVNIEVKSKTKAILVPVSSLVMDDSKNYVWI
VDEQQKAKKVEVSLGNADAENQEITSGLT
NGAKVISNPTSSLEEGKEVKADEATN

[261] SEQ ID NO: 18, proteína de fusão SP0785-SP1500:
MFRQPSQTALKDEPTHLVVAKEGSVASSVLLSGTVTAKNEQYVYFDA
SKGDLDEILVSVGDKVSEGQALVKYSSSEAQAAYDSASRAVARADR
HINELNQARNEAASAPAPQLPAPVGGEDATVQSPTPVAGNSVASIDA
QLGDARDARADAAAQLSKAQSQLDATTVLSTLEGTVVEVNSNVSKS
PTGASQVMVHIVSNENLQVKGELSEYNLANLSVGQEVSFTSKVYPDK
KWTGKLSYISDYPKNNGEAASPAAGNNTGSKYPYTIDVTGEVGDLKQ
GFSVNIEVKSKTKAILVPVSSLVMDDSKNYVWIVDEQQKAKKVEVSLG
NADAENQEITSGLTNGAKVISNPTSSLEEGKEVKADEATNTSGDNWS
KYQSNKSITIGFDSTFVPMGFAQKDGSYAGFDIDLATAVFEKYGITVN
WQPIDWDLKEAELTKGTIDLIWNGYSATDERREKVAFSNSYMKNEQV
LVTKKSSGITTAKDMTGKTLGAQAGSSGYADFEANPEILKNIVANKEA
NQYQTFNEALIDLKNDRIDGLLIDRVYANYYLEAEGVLNDYNVFTVGL
ETEAFAVGARKEDTNLVKKINEAFSSLYKDGKFQEISQKWFGEDVAT
KEVKEGQ

[262] SEQ ID NO: 19, proteína de fusão Rhavi-SP1500-SP0785:
MFDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRA
QGTGCQNSPYPLTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATGWTGYAQ
VNGNNTEIVTSWNLAYEGGSGP
AIEQGQDTFQYVPTTENKSLLKDTSGDNWSKYQSNKSITIGFDSTFVP
MGFAQKDGSYAGFDIDLATAVFEKYGITVNWQPIDWDLKEAELTKGTI
DLIWNGYSATDERREKVAFSNSYMKNEQVLVTKKSSGITTAKDMTGK
TLGAQAGSSGYADFEANPEILKNIVANKEANQYQTFNEALIDLKNDRI
DGLLIDRVYANYYLEAEGVLNDYNVFTVGLETEAFAVGARKEDTNLV
KKINEAFSSLYKDGKFQEISQKWFGEDVATKEVKEGQFRQPSQTALK
DEPTHLVVAKEGSVASSVLLSGTVTAKNEQYVYFDASKGDLDEILVS
VGDKVSEGQALVKYSSSEAQAAYDSASRAVARADRHINELNQARNE

AASAPAPQLPAPVGGEDATVQSPTPVAGNSVASIDAQLGDARDARA
DAAAQLSKAQSQLDATTVLSTLEGTVVEVNSNVSKSPTGASQVMVHI
VSNENLQVKGELSEYNLANLSVGQEVSFTSKVYPDKKWTGKLSYISD
YPKNNGEAASPAAGNNTGSKYPYTIDVTGEVGDLKQGFSVNIEVKSK
TKAILVPVSSLVMDDSKNYVWIVDEQQKAKKVEVSLGNADAENQEIT
SGLT NGAKVISNPTSSLEEGKEVKADEATN

[263] SEQ ID NO: 20, proteína de fusão Rhavi-SP0785-SP1500:
MFDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRA
QGTGCQNSPYP
LTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATGWTGYAQVNGNNTEIVTSW
NLAYEGGSGP
AIEQGQDTFQYVPTTENKSLLKDFRQPSQTALKDEPTHLVVAKEGSV
ASSVLLSGTVTAKNEQYVYFDASKGDLDEILVSVGDKVSEGQALVKY
SSSEAQAAYDSASRAVARADRHINELNQARNEAASAPAPQLPAPVG
GEDATVQSPTPVAGNSVASIDAQLGDARDARADAAAQLSKAQSQLD
ATTVLSTLEGTVVEVNSNVSKSPTGASQVMVHIVSNENLQVKGELSE
YNLANLSVGQEVSFTSKVYPDKKWTGKLSYISDYPKNNGEAASPAA
GNNTGSKYPYTIDVTGEVGDLKQGFSVNIEVKSKTKAILVPVSSLVMD
DSKNYVWIVDEQQKAKKVEVSLGNADAENQEITSGLTNGAKVISNPT
SSLEEGKEVKADEATNTSGDNWSKYQSNKSITIGFDSTFVPMGFAQK
DGSYAGFDIDLATAVFEKYGITVNWQPIDWDLKEAELTKGTIDLIWNG
YSATDERREKVAFSNSYMKNEQVLVTKKSSGITTAKDMTGKTLGAQA
GSSGYADFEANPEILKNIVANKEANQYQTFNEALIDLKNDRIDGLLIDR
VYANYYLEAEGVLNDYNVFTVGLE
TEAFAVGARKEDTNLVKKINEAFSSLYKDGKFQEISQKWFGEDVATK
EVKEGQ

[264] SEQ ID NO: 21, proteína de fusão SP1500-SP0785-Rhavi:
MTSGDNWSKYQSNKSITIGFDSTFVPMGFAQKDGSYAGFDIDLATAV
FEKYGITVNWQPIDWDLKEAELTKGTIDLIWNGYSATDERREKVAFSN
SYMKNEQVLVTKKSSGITTAKDMTGKTLGAQAGSSGYADFEANPEIL

KNIVANKEANQYQTFNEALIDLKNDRIDGLLIDRVYANYYLEAEGVLND
YNVFTVGLETEAFAVGARKEDTNLVKKINEAFSSLYKDGKFQEISQK
WFGEDVATKEVKEGQFRQPSQTALKDEPTHLVVAKEGSVASSVLLS
GTVTAKNEQYVYFDASKGDLDEILVSVGDKVSEGQALVKYSSSEAQA
AYDSASRAVARADRHINELNQARNEAASAPAPQLPAPVGGEDATVQ
SPTPVAGNSVASIDAQLGDARDARADAAAQLSKAQSQLDATTVLSTL
EGTVVEVNSNVSKSPTGASQVMVHIVSNENLQVKGELSEYNLANLSV
GQEVSFTSKVYPDKKWTGKLSYISDYPKNNGEAASPAAGNNTGSKY
PYTIDVTGEVGDLKQGFSVNIEVKSKTKAILVPVSSLVMDDSKNYVWI
VDEQQKAKKVEVSLGNADAENQEITSGLTNGAKVISNPTSSLEEGKE
VKADEATNFDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSG
QYVNRAQGTGCQNSPYPLTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATG
WTGYAQVNGNNTEIVTSWNLAYEGGSGP
AIEQGQDTFQYVPTTENKSLLKD

[265] SEQ ID NO: 22, proteína de fusão SP0785-SP1500-Rhavi:

MFRQPSQTALKDEPTHLVVAKEGSVASSVLLSGTVTAKNEQYVYFDA
SKGDLDEILVSV
GDKVSEGQALVKYSSSEAQAAYDSASRAVARADRHINELNQARNEA
ASAPAPQLPAP
VGGEDATVQSPTPVAGNSVASIDAQLGDARDARADAAAQLSKAQSQ
LDATTVLSTLE
GTVVEVNSNVSKSPTGASQVMVHIVSNENLQVKGELSEYNLANLSV
GQEVSFTSKV
YPDKKWTGKLSYISDYPKNNGEAASPAAGNNTGSKYPYTIDVTGEVG
DLKQGFSVN
IEVKSKTKAILVPVSSLVMDDSKNYVWIVDEQQKAKKVEVSLGNADAE
NQEITSGLT
NGAKVISNPTSSLEEGKEVKADEATNTSGDNWSKYQSNKSITIGFDS
TFVPMGFAQKDGSYAGFDIDLATAVFEKYGITVNWQPIDWDLKEAEL
TKGTIDLIWNGYSATDERREKVAFSNSYMKNEQVLVTKKSSGITTAKD

MTGKTLGAQAGSSGYADFEANPEILKNIVANKEANQYQTFNEALIDLK
NDRIDGLLIDRVYANYYLEAEGVLNDYNVFTVGLETEAFAVGARKEDT
NLVKKINEAFSSLYKDGKFQEISQKWFGEDVATKEVKEGQFDASNFK
DFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNS
PYPLTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATGWTGYAQVNGNNTEIV
TSWNLAYEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKSLLKD

[266] SEQ ID NO: 23, proteína de fusão CP1, ligante Rhavi (GGGGSSS)-SP1500-ligante (AAA)-SP0785:

MFDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRA
QGTGCQNSPYP
LTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATGWTGYAQVNGNNTEIVTSW
NLAYEGGSGP
AIEQGQDTFQYVPTTENKSLLKDGGGGSSSTSGDNWSKYQSNKSITI
GFDSTFVPMGF
AQKDGSYAGFDIDLATAVFEKYGITVNWQPIDWDLKEAELTKGTIDLI
WNGYSATDE
RREKVAFSNSYMKNEQVLVTKKSSGITTAKDMTGKTLGAQAGSSGY
ADFEANPEILK
NIVANKEANQYQTFNEALIDLKNDRIDGLLIDRVYANYYLEAEGVLNDY
NVFTVGLE
TEAFAVGARKEDTNLVKKINEAFSSLYKDGKFQEISQKWFGEDVATK
EVKEGQAAAF
RQPSQTALKDEPTHLVVAKEGSVASSVLLSGTVTAKNEQYVYFDASK
GDLDEILVSV
GDKVSEGQALVKYSSSEAQAAYDSASRAVARADRHINELNQARNEA
ASAPAPQLPAP
VGGEDATVQSPTPVAGNSVASIDAQLGDARDARADAAAQLSKAQSQ
LDATTVLSTLE
GTVVEVNSNVSKSPTGASQVMVHIVSNENLQVKGELSEYNLANLSV
GQEVSFTSKV

YPDKKWTGKLSYISDYPKNNGEAASPAAGNNTGSKYPYTIDVTGEVG
DLKQGFSVN
IEVKSKTKAILVPVSSLVMDDSKNYVWIVDEQQKAKKVEVSLGNADAE
NQEITSGLT NGAKVISNPTSSLEEGKEVKADEATN

[267] SEQ ID NO: 24, proteína de fusão Rhavi-GGGGSSS-SP0785-AAA-SP1500:

MFDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRA
QGTGCQNSPYP
LTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATGWTGYAQVNGNNTEIVTSW
NLAYEGGSGP
AIEQGQDTFQYVPTTENKSLLKDGGGGSSSFRQPSQTALKDEPTHLV
VAKEGSVASSVLLSGTVTAKNEQYVYFDASKGDLDEILVSVGDKVSE
GQALVKYSSSEAQAAYDSASRAVARADRHINELNQARNEAASAPAP
QLPAPVGGEDATVQSPTPVAGNSVASIDAQLGDARDARADAAAQLS
KAQSQLDATTVLSTLEGTVVEVNSNVSKSPTGASQVMVHIVSNENLQ
VKGELSEYNLANLSVGQEVSFTSKVYPDKKWTGKLSYISDYPKNNGE
AASPAAGNNTGSKYPYTIDVTGEVGDLKQGFSVNIEVKSKTKAILVPV
SSLVMDDSKNYVWIVDEQQKAKKVEVSLGNADAENQEITSGLTNGA
KVISNPTSSLEEGKEVKADEATNAAATSGDNWSKYQSNKSITIGFDST
FVPMGFAQKDGSYAGFDIDLATAVFEKYGITVNWQPIDWDLKEAELT
KGTIDLIWNGYSATDERREKVAFSNSYMKNEQVLVTKKSSGITTAKD
MTGKTLGAQAGSSGYADFEANPEILKNIVANKEANQYQTFNEALIDLK
NDRIDGLLIDRVYANYYLEAEGVLNDYNVFTVGLETEAFAVGARKEDT
NLVKKINEAFSSLYKDGKFQEISQKWFGEDVATKEVKEGQ

[268] SEQ ID NO: 25, proteína de fusão SP1500-GGGGSSS-SP0785-AAA-Rhavi:

MTSGDNWSKYQSNKSITIGFDSTFVPMGFAQKDGSYAGFDIDLATAV
FEKYGITVNWQPIDWDLKEAELTKGTIDLIWNGYSATDERREKVAFSN
SYMKNEQVLVTKKSSGITTAKDMTGKTLGAQAGSSGYADFEANPEIL
KNIVANKEANQYQTFNEALIDLKNDRIDGLLIDRVYANYYLEAEGVLND

YNVFTVGLETEAFAVGARKEDTNLVKKINEAFSSLYKDGKFQEISQK
WFGEDVATKEVKEGQGGGGSSSFRQPSQTALKDEPTHLVVAKEGS
VASSVLLSGTVTAKNEQYVYFDASKGDLDEILVSVGDKVSEGQALVK
YSSSEAQAAYDSASRAVARADRHINELNQARNEAASAPAPQLPAPV
GGEDATVQSPTPVAGNSVASIDAQLGDARDARADAAAQLSKAQSQL
DATTVLSTLEGTVVEVNSNVSKSPTGASQVMVHIVSNENLQVKGELS
EYNLANLSVGQEVSFTSKVYPDKKWTGKLSYISDYPKNNGEAASPAA
GNNTGSKYPYTIDVTGEVGDLKQGFSVNIEVKSKTKAILVPVSSLVMD
DSKNYVWIVDEQQKAKKVEVSLGNADAENQEITSGLTNGAKVISNPT
SSLEEGKEVKADEATNAAAFDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMI
IQVDSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNSPYPLTGRVNGTFIAFSVGWNN
STENCNSATGWTGYAQVNGNNTEIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQDT
FQYVPTTENKSLLKD

[269] SEQ ID NO:26, proteína de fusão SP0785-ligante (GGGGSSS)-SP1500-ligante (AAA)-Rhavi:

MFRQPSQTALKDEPTHLVVAKEGSVASSVLLSGTVTAKNEQYVYFDA
SKGDLDEILVSV
GDKVSEGQALVKYSSSEAQAAYDSASRAVARADRHINELNQARNEA
ASAPAPQLPAP
VGGEDATVQSPTPVAGNSVASIDAQLGDARDARADAAAQLSKAQSQ
LDATTVLSTLE
GTVVEVNSNVSKSPTGASQVMVHIVSNENLQVKGELSEYNLANLSV
GQEVSFTSKVYPDKKWTGKLSYISDYPKNNGEAASPAAGNNTGSKY
PYTIDVTGEVGDLKQGFSVNIEVKSKTKAILVPVSSLVMDDSKNYVWI
VDEQQKAKKVEVSLGNADAENQEITSGLTNGAKVISNPTSSLEEGKE
VKADEATNGGGGSSSTSGDNWSKYQSNKSITIGFDSTFVPMGFAQK
DGSYAGFDIDLATAVFEKYGITVNWQPIDWDLKEAELTKGTIDLIWNG
YSATDERREKVAFSNSYMNEQVLVTKKSSGITTAKDMTGKTLGAQA
GSSGYADFEANPEILKNIVANKEANQYQTFNEALIDLKNDRIDGLLIDR
VYANYYLEAEGVLNDYNVFTVGLETEAFAVGARKEDTNLVKKINEAF

SSLYKDGKFQEISQKWFGEDVATKEVKEGQAAAFDASNFKDFSSIAS
ASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNSPYPLTG
RVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATGWTGYAQVNGNNTEIVTSWNLA
YEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKSLLKD

[270] SEQ ID NO: 27, sequência de ácido nucleico otimizado por códon que codifica a proteína de fusão SP1500-SP0785

ATGACCAGCGGCGACAATTGGTCCAAATACCAGAGCAACAAGAGC
ATCACGATCGGCTTCGACAGCACTTTTGTGCCGATGGGTTTCGCG
CAAAAAGACGGTAGCTACGCGGGTTTCGATATTGACCTGGCGACC
GCTGTCTTTGAGAAATACGGCATTACGGTTAATTGGCAGCCGATT
GATTGGGACCTGAAAGAGGCCGAACTCACCAAAGGCACCATCGA
CCTGATCTGGAATGGTTACTCCGCAACCGATGAGCGTCGCGAAAA
AGTTGCCTTCAGCAACAGCTATATGAAGAATGAACAAGTGTTGGTA
ACCAAGAAATCTAGCGGCATTACGACCGCGAAAGACATGACCGGT
AAGACGCTGGGTGCGCAGGCCGGTAGCTCTGGCTATGCGGATTT
CGAGGCGAATCCTGAGATTCTGAAAAACATCGTTGCGAATAAAGA
GGCGAACCAGTACCAGACCTTTAACGAAGCACTGATCGACCTGAA
AAACGATCGCATTGACGGTCTGCTGATCGATCGTGTGTACGCGAA
CTATTATCTGGAAGCCGAGGGCGTTCTGAACGATTATAATGTTTTT
ACCGTGGGTCTGGAGACTGAGGCATTCGCGGTTGGTGCGCGCAA
GGAAGATACCAACCTGGTTAAAAAGATTAATGAGGCATTTAGCTCA
CTGTACAAGGACGGCAAGTTCCAAGAAATTAGCCAGAAGTGGTTC
GGTGAAGATGTTGCGACGAAAGAGGTTAAAGAGGGCCAATTTCGC
CAACCGAGCCAGACTGCGTTGAAAGATGAGCCGACCCATCTGGTT
GTTGCGAAAGAGGGCAGCGTGGCATCGAGCGTGCTGCTGAGCG
GTACGGTTACTGCCAAAAACGAACAATACGTGTACTTCGATGCTA
GCAAGGGTGATCTGGATGAAATTCTGGTGAGCGTGGGTGACAAA
GTTAGCGAAGGCCAGGCACTGGTGAAGTATTCATCCTCCGAGGC
ACAGGCAGCGTACGACAGCGCAAGCCGCGCAGTGGCGCGTGCC
GACCGTCACATTAACGAATTGAACCAAGCGCGTAACGAGGCCGCA

AGCGCGCCAGCACCGCAGCTGCCGGCTCCGGTGGGTGGCGAAG
ATGCGACGGTGCAGAGCCCGACCCCGGTTGCGGGTAATTCGGTC
GCCAGCATCGATGCGCAGCTGGGTGACGCGCGTGATGCCCGTGC
GGATGCGGCTGCTCAACTGAGCAAGGCTCAGAGCCAACTGGACG
CGACGACGGTGCTGAGCACCTTGGAGGGTACCGTTGTCGAAGTC
AACAGCAATGTGAGCAAGAGCCCAACGGGTGCGAGCCAGGTTAT
GGTCCACATTGTGAGCAATGAAAACTTACAGGTCAAGGGTGAGCT
GAGCGAGTATAACCTGGCGAATCTGAGCGTTGGTCAAGAGGTCA
GCTTTACCAGCAAGGTCTACCCGGATAAGAAATGGACCGGCAAGT
TGAGCTACATCAGCGACTACCCGAAGAACAATGGCGAGGCAGCC
TCCCCGGCAGCCGGCAACAATACCGGCTCTAAGTATCCGTACACC
ATCGACGTAACCGGTGAGGTCGGCGACCTGAAACAGGGTTTTAG
CGTGAATATCGAAGTGAAGTCCAAGACCAAGGCAATTTTGGTTCC
GGTTAGCTCCCTGGTGATGGACGATAGCAAGAATTATGTGTGGAT
TGTCGACGAGCAACAGAAAGCGAAAAAAGTTGAAGTGAGCCTGG
GCAATGCTGATGCCGAGAACCAAGAAATCACGTCTGGTCTGACCA
ACGGTGCGAAAGTTATTAGCAACCCGACCAGCAGCCTGGAAGAG
GGTAAAGAGGTCAAAGCCGACGAAGCTACGAAC

[271] SEQ ID NO: 28, sequência de ácido nucleico otimizada por códon que codifica a proteína de fusão SP0785-SP1500

ATGTTTCGCCAACCGAGCCAGACTGCGTTGAAAGATGAGCCGACC
CATCTGGTTGTTGCGAAAGAGGGCAGCGTGGCATCGAGCGTGCT
GCTGAGCGGTACGGTTACTGCCAAAAACGAACAATACGTGTACTT
CGATGCTAGCAAGGGTGATCTGGATGAAATTCTGGTGAGCGTGG
GTGACAAAGTTAGCGAAGGCCAGGCACTGGTGAAGTATTCATCCT
CCGAGGCACAGGCAGCGTACGACAGCGCAAGCCGCGCAGTGGC
GCGTGCCGACCGTCACATTAACGAATTGAACCAAGCGCGTAACGA
GGCCGCAAGCGCGCCAGCACCGCAGCTGCCGGCTCCGGTGGGT
GGCGAAGATGCGACGGTGCAGAGCCCGACCCCGGTTGCGGGTA
ATTCGGTCGCCAGCATCGATGCGCAGCTGGGTGACGCGCGTGAT

GCCCGTGCGGATGCGGCTGCTCAACTGAGCAAGGCTCAGAGCCA
ACTGGACGCGACGACGGTGCTGAGCACCTTGGAGGGTACCGTTG
TCGAAGTCAACAGCAATGTGAGCAAGAGCCCAACGGGTGCGAGC
CAGGTTATGGTCCACATTGTGAGCAATGAAAACTTACAGGTCAAG
GGTGAGCTGAGCGAGTATAACCTGGCGAATCTGAGCGTTGGTCA
AGAGGTCAGCTTTACCAGCAAGGTCTACCCGGATAAGAAATGGAC
CGGCAAGTTGAGCTACATCAGCGACTACCCGAAGAACAATGGCG
AGGCAGCCTCCCCGGCAGCCGGCAACAATACCGGCTCTAAGTAT
CCGTACACCATCGACGTAACCGGTGAGGTCGGCGACCTGAAACA
GGGTTTTAGCGTGAATATCGAAGTGAAGTCCAAGACCAAGGCAAT
TTTGGTTCCGGTTAGCTCCCTGGTGATGGACGATAGCAAGAATTA
TGTGTGGATTGTCGACGAGCAACAGAAAGCGAAAAAAGTTGAAGT
GAGCCTGGGCAATGCTGATGCCGAGAACCAAGAAATCACGTCTG
GTCTGACCAACGGTGCGAAAGTTATTAGCAACCCGACCAGCAGCC
TGGAAGAGGGTAAAGAGGTCAAAGCCGACGAAGCTACGAACACC
AGCGGCGACAATTGGTCCAAATACCAGAGCAACAAGAGCATCACG
ATCGGCTTCGACAGCACTTTTGTGCCGATGGGTTTCGCGCAAAAA
GACGGTAGCTACGCGGGTTTCGATATTGACCTGGCGACCGCTGT
CTTTGAGAAATACGGCATTACGGTTAATTGGCAGCCGATTGATTG
GGACCTGAAAGAGGCCGAACTCACCAAAGGCACCATCGACCTGA
TCTGGAATGGTTACTCCGCAACCGATGAGCGTCGCGAAAAAGTTG
CCTTCAGCAACAGCTATATGAAGAATGAACAAGTGTTGGTAACCAA
GAAATCTAGCGGCATTACGACCGCGAAAGACATGACCGGTAAGAC
GCTGGGTGCGCAGGCCGGTAGCTCTGGCTATGCGGATTTCGAGG
CGAATCCTGAGATTCTGAAAAACATCGTTGCGAATAAAGAGGCGA
ACCAGTACCAGACCTTTAACGAAGCACTGATCGACCTGAAAAACG
ATCGCATTGACGGTCTGCTGATCGATCGTGTGTACGCGAACTATT
ATCTGGAAGCCGAGGGCGTTCTGAACGATTATAATGTTTTTACCGT
GGGTCTGGAGACTGAGGCATTCGCGGTTGGTGCGCGCAAGGAAG
ATACCAACCTGGTTAAAAAGATTAATGAGGCATTTAGCTCACTGTA

CAAGGACGGCAAGTTCCAAGAAATTAGCCAGAAGTGGTTCGGTGA
AGATGTTGCGACGAAAGAGGTTAAAGAGGGCCAA

[272] SEQ ID NO: 29, sequência de ácido nucleico otimizado por códon que codifica a proteína de fusão Rhavi-SP1500-SP0785:

ATGTTCGACGCATCCAACTTTAAAGACTTTAGCAGCATCGCGTCC
GCAAGCTCTAGCTGGCAGAATCAATCTGGTAGCACCATGATTATC
CAAGTGGACAGCTTTGGTAACGTCAGCGGTCAATATGTTAATCGT
GCACAGGGTACGGGTTGTCAGAATTCTCCGTACCCGCTGACCGG
TCGTGTTAACGGCACGTTCATCGCTTTCAGCGTCGGTTGGAACAA
TTCTACTGAAAATTGCAACAGCGCGACCGGTTGGACGGGCTATGC
ACAAGTGAATGGCAATAACACCGAAATCGTCACGTCCTGGAATCT
GGCGTATGAGGGTGGCAGCGGTCCGGCTATTGAACAGGGCCAG
GATACCTTCCAATACGTCCCTACGACCGAGAATAAGTCCCTTCTG
AAAGACACCAGCGGCGACAATTGGTCCAAATACCAGAGCAACAAG
AGCATCACGATCGGCTTCGACAGCACTTTTGTGCCGATGGGTTTC
GCGCAAAAAGACGGTAGCTACGCGGGTTTCGATATTGACCTGGC
GACCGCTGTCTTTGAGAAATACGGCATTACGGTTAATTGGCAGCC
GATTGATTGGGACCTGAAAGAGGCCGAACTCACCAAAGGCACCAT
CGACCTGATCTGGAATGGTTACTCCGCAACCGATGAGCGTCGCG
AAAAAGTTGCCTTCAGCAACAGCTATATGAAGAATGAACAAGTGTT
GGTAACCAAGAAATCTAGCGGCATTACGACCGCGAAAGACATGAC
CGGTAAGACGCTGGGTGCGCAGGCCGGTAGCTCTGGCTATGCGG
ATTTCGAGGCGAATCCTGAGATTCTGAAAAACATCGTTGCGAATAA
AGAGGCGAACCAGTACCAGACCTTTAACGAAGCACTGATCGACCT
GAAAAACGATCGCATTGACGGTCTGCTGATCGATCGTGTGTACGC
GAACTATTATCTGGAAGCCGAGGGCGTTCTGAACGATTATAATGTT
TTTACCGTGGGTCTGGAGACTGAGGCATTCGCGGTTGGTGCGCG
CAAGGAAGATACCAACCTGGTTAAAAAGATTAATGAGGCATTTAGC
TCACTGTACAAGGACGGCAAGTTCCAAGAAATTAGCCAGAAGTGG
TTCGGTGAAGATGTTGCGACGAAAGAGGTTAAAGAGGGCCAATTT

CGCCAACCGAGCCAGACTGCGTTGAAAGATGAGCCGACCCATCT
GGTTGTTGCGAAAGAGGGCAGCGTGGCATCGAGCGTGCTGCTGA
GCGGTACGGTTACTGCCAAAAACGAACAATACGTGTACTTCGATG
CTAGCAAGGGTGATCTGGATGAAATTCTGGTGAGCGTGGGTGACA
AAGTTAGCGAAGGCCAGGCACTGGTGAAGTATTCATCCTCCGAGG
CACAGGCAGCGTACGACAGCGCAAGCCGCGCAGTGGCGCGTGC
CGACCGTCACATTAACGAATTGAACCAAGCGCGTAACGAGGCCG
CAAGCGCGCCAGCACCGCAGCTGCCGGCTCCGGTGGGTGGCGA
AGATGCGACGGTGCAGAGCCCGACCCCGGTTGCGGGTAATTCGG
TCGCCAGCATCGATGCGCAGCTGGGTGACGCGCGTGATGCCCGT
GCGGATGCGGCTGCTCAACTGAGCAAGGCTCAGAGCCAACTGGA
CGCGACGACGGTGCTGAGCACCTTGGAGGGTACCGTTGTCGAAG
TCAACAGCAATGTGAGCAAGAGCCCAACGGGTGCGAGCCAGGTT
ATGGTCCACATTGTGAGCAATGAAAACTTACAGGTCAAGGGTGAG
CTGAGCGAGTATAACCTGGCGAATCTGAGCGTTGGTCAAGAGGTC
AGCTTTACCAGCAAGGTCTACCCGGATAAGAAATGGACCGGCAAG
TTGAGCTACATCAGCGACTACCCGAAGAACAATGGCGAGGCAGC
CTCCCCGGCAGCCGGCAACAATACCGGCTCTAAGTATCCGTACAC
CATCGACGTAACCGGTGAGGTCGGCGACCTGAAACAGGGTTTTA
GCGTGAATATCGAAGTGAAGTCCAAGACCAAGGCAATTTTGGTTC
CGGTTAGCTCCCTGGTGATGGACGATAGCAAGAATTATGTGTGGA
TTGTCGACGAGCAACAGAAAGCGAAAAAAGTTGAAGTGAGCCTGG
GCAATGCTGATGCCGAGAACCAAGAAATCACGTCTGGTCTGACCA
ACGGTGCGAAAGTTATTAGCAACCCGACCAGCAGCCTGGAAGAG
GGTAAAGAGGTCAAAGCCGACGAAGCTACGAAC

[273] SEQ ID NO: 30, sequência de ácido nucleico otimizada por códon que codifica a proteína de fusão Rhavi-SP0785-SP1500:

ATGTTCGACGCATCCAACTTTAAAGACTTTAGCAGCATCGCGTCC
GCAAGCTCTAGCTGGCAGAATCAATCTGGTAGCACCATGATTATC
CAAGTGGACAGCTTTGGTAACGTCAGCGGTCAATATGTTAATCGT

GCACAGGGTACGGGTTGTCAGAATTCTCCGTACCCGCTGACCGG
TCGTGTTAACGGCACGTTCATCGCTTTCAGCGTCGGTTGGAACAA
TTCTACTGAAAATTGCAACAGCGCGACCGGTTGGACGGGCTATGC
ACAAGTGAATGGCAATAACACCGAAATCGTCACGTCCTGGAATCT
GGCGTATGAGGGTGGCAGCGGTCCGGCTATTGAACAGGGCCAG
GATACCTTCCAATACGTCCCTACGACCGAGAATAAGTCCCTTCTG
AAAGACTTTCGCCAACCGAGCCAGACTGCGTTGAAAGATGAGCCG
ACCCATCTGGTTGTTGCGAAAGAGGGCAGCGTGGCATCGAGCGT
GCTGCTGAGCGGTACGGTTACTGCCAAAAACGAACAATACGTGTA
CTTCGATGCTAGCAAGGGTGATCTGGATGAAATTCTGGTGAGCGT
GGGTGACAAAGTTAGCGAAGGCCAGGCACTGGTGAAGTATTCATC
CTCCGAGGCACAGGCAGCGTACGACAGCGCAAGCCGCGCAGTG
GCGCGTGCCGACCGTCACATTAACGAATTGAACCAAGCGCGTAAC
GAGGCCGCAAGCGCGCCAGCACCGCAGCTGCCGGCTCCGGTGG
GTGGCGAAGATGCGACGGTGCAGAGCCCGACCCCGGTTGCGGG
TAATTCGGTCGCCAGCATCGATGCGCAGCTGGGTGACGCGCGTG
ATGCCCGTGCGGATGCGGCTGCTCAACTGAGCAAGGCTCAGAGC
CAACTGGACGCGACGACGGTGCTGAGCACCTTGGAGGGTACCGT
TGTCGAAGTCAACAGCAATGTGAGCAAGAGCCCAACGGGTGCGA
GCCAGGTTATGGTCCACATTGTGAGCAATGAAAACTTACAGGTCA
AGGGTGAGCTGAGCGAGTATAACCTGGCGAATCTGAGCGTTGGT
CAAGAGGTCAGCTTTACCAGCAAGGTCTACCCGGATAAGAAATGG
ACCGGCAAGTTGAGCTACATCAGCGACTACCCGAAGAACAATGGC
GAGGCAGCCTCCCCGGCAGCCGGCAACAATACCGGCTCTAAGTA
TCCGTACACCATCGACGTAACCGGTGAGGTCGGCGACCTGAAAC
AGGGTTTTAGCGTGAATATCGAAGTGAAGTCCAAGACCAAGGCAA
TTTTGGTTCCGGTTAGCTCCCTGGTGATGGACGATAGCAAGAATT
ATGTGTGGATTGTCGACGAGCAACAGAAAGCGAAAAAAGTTGAAG
TGAGCCTGGGCAATGCTGATGCCGAGAACCAAGAAATCACGTCTG
GTCTGACCAACGGTGCGAAAGTTATTAGCAACCCGACCAGCAGCC

TGGAAGAGGGTAAAGAGGTCAAAGCCGACGAAGCTACGAACACC
AGCGGCGACAATTGGTCCAAATACCAGAGCAACAAGAGCATCACG
ATCGGCTTCGACAGCACTTTTGTGCCGATGGGTTTCGCGCAAAAA
GACGGTAGCTACGCGGGTTTCGATATTGACCTGGCGACCGCTGT
CTTTGAGAAATACGGCATTACGGTTAATTGGCAGCCGATTGATTG
GGACCTGAAAGAGGCCGAACTCACCAAAGGCACCATCGACCTGA
TCTGGAATGGTTACTCCGCAACCGATGAGCGTCGCGAAAAAGTTG
CCTTCAGCAACAGCTATATGAAGAATGAACAAGTGTTGGTAACCAA
GAAATCTAGCGGCATTACGACCGCGAAAGACATGACCGGTAAGAC
GCTGGGTGCGCAGGCCGGTAGCTCTGGCTATGCGGATTTCGAGG
CGAATCCTGAGATTCTGAAAAACATCGTTGCGAATAAAGAGGCGA
ACCAGTACCAGACCTTTAACGAAGCACTGATCGACCTGAAAAACG
ATCGCATTGACGGTCTGCTGATCGATCGTGTGTACGCGAACTATT
ATCTGGAAGCCGAGGGCGTTCTGAACGATTATAATGTTTTTACCGT
GGGTCTGGAGACTGAGGCATTCGCGGTTGGTGCGCGCAAGGAAG
ATACCAACCTGGTTAAAAAGATTAATGAGGCATTTAGCTCACTGTA
CAAGGACGGCAAGTTCCAAGAAATTAGCCAGAAGTGGTTCGGTGA
AGATGTTGCGACGAAAGAGGTTAAAGAGGGCCAA

[274] SEQ ID NO: 31, sequência de ácido nucleico otimizado por códon que codifica a proteína de fusão SP1500-SP0785-Rhavi:

ATGACCAGCGGCGACAATTGGTCCAAATACCAGAGCAACAAGAGC
ATCACGATCGGCTTCGACAGCACTTTTGTGCCGATGGGTTTCGCG
CAAAAAGACGGTAGCTACGCGGGTTTCGATATTGACCTGGCGACC
GCTGTCTTTGAGAAATACGGCATTACGGTTAATTGGCAGCCGATT
GATTGGGACCTGAAAGAGGCCGAACTCACCAAAGGCACCATCGA
CCTGATCTGGAATGGTTACTCCGCAACCGATGAGCGTCGCGAAAA
AGTTGCCTTCAGCAACAGCTATATGAAGAATGAACAAGTGTTGGTA
ACCAAGAAATCTAGCGGCATTACGACCGCGAAAGACATGACCGGT
AAGACGCTGGGTGCGCAGGCCGGTAGCTCTGGCTATGCGGATTT
CGAGGCGAATCCTGAGATTCTGAAAAACATCGTTGCGAATAAAGA

GGCGAACCAGTACCAGACCTTTAACGAAGCACTGATCGACCTGAA
AAACGATCGCATTGACGGTCTGCTGATCGATCGTGTGTACGCGAA
CTATTATCTGGAAGCCGAGGGCGTTCTGAACGATTATAATGTTTTT
ACCGTGGGTCTGGAGACTGAGGCATTCGCGGTTGGTGCGCGCAA
GGAAGATACCAACCTGGTTAAAAAGATTAATGAGGCATTTAGCTCA
CTGTACAAGGACGGCAAGTTCCAAGAAATTAGCCAGAAGTGGTTC
GGTGAAGATGTTGCGACGAAAGAGGTTAAAGAGGGCCAATTTCGC
CAACCGAGCCAGACTGCGTTGAAAGATGAGCCGACCCATCTGGTT
GTTGCGAAAGAGGGCAGCGTGGCATCGAGCGTGCTGCTGAGCG
GTACGGTTACTGCCAAAAACGAACAATACGTGTACTTCGATGCTA
GCAAGGGTGATCTGGATGAAATTCTGGTGAGCGTGGGTGACAAA
GTTAGCGAAGGCCAGGCACTGGTGAAGTATTCATCCTCCGAGGC
ACAGGCAGCGTACGACAGCGCAAGCCGCGCAGTGGCGCGTGCC
GACCGTCACATTAACGAATTGAACCAAGCGCGTAACGAGGCCGCA
AGCGCGCCAGCACCGCAGCTGCCGGCTCCGGTGGGTGGCGAAG
ATGCGACGGTGCAGAGCCCGACCCCGGTTGCGGGTAATTCGGTC
GCCAGCATCGATGCGCAGCTGGGTGACGCGCGTGATGCCCGTGC
GGATGCGGCTGCTCAACTGAGCAAGGCTCAGAGCCAACTGGACG
CGACGACGGTGCTGAGCACCTTGGAGGGTACCGTTGTCGAAGTC
AACAGCAATGTGAGCAAGAGCCCAACGGGTGCGAGCCAGGTTAT
GGTCCACATTGTGAGCAATGAAAACTTACAGGTCAAGGGTGAGCT
GAGCGAGTATAACCTGGCGAATCTGAGCGTTGGTCAAGAGGTCA
GCTTTACCAGCAAGGTCTACCCGGATAAGAAATGGACCGGCAAGT
TGAGCTACATCAGCGACTACCCGAAGAACAATGGCGAGGCAGCC
TCCCCGGCAGCCGGCAACAATACCGGCTCTAAGTATCCGTACACC
ATCGACGTAACCGGTGAGGTCGGCGACCTGAAACAGGGTTTTAG
CGTGAATATCGAAGTGAAGTCCAAGACCAAGGCAATTTTGGTTCC
GGTTAGCTCCCTGGTGATGGACGATAGCAAGAATTATGTGTGGAT
TGTCGACGAGCAACAGAAAGCGAAAAAAGTTGAAGTGAGCCTGG
GCAATGCTGATGCCGAGAACCAAGAAATCACGTCTGGTCTGACCA

ACGGTGCGAAAGTTATTAGCAACCCGACCAGCAGCCTGGAAGAG
GGTAAAGAGGTCAAAGCCGACGAAGCTACGAACTTCGACGCATC
CAACTTTAAAGACTTTAGCAGCATCGCGTCCGCAAGCTCTAGCTG
GCAGAATCAATCTGGTAGCACCATGATTATCCAAGTGGACAGCTT
TGGTAACGTCAGCGGTCAATATGTTAATCGTGCACAGGGTACGGG
TTGTCAGAATTCTCCGTACCCGCTGACCGGTCGTGTTAACGGCAC
GTTCATCGCTTTCAGCGTCGGTTGGAACAATTCTACTGAAAATTGC
AACAGCGCGACCGGTTGGACGGGCTATGCACAAGTGAATGGCAA
TAACACCGAAATCGTCACGTCCTGGAATCTGGCGTATGAGGGTGG
CAGCGGTCCGGCTATTGAACAGGGCCAGGATACCTTCCAATACGT
CCCTACGACCGAGAATAAGTCCCTTCTGAAAGAC

[275] SEQ ID NO: 32, sequência de ácido nucleico otimizada por códon que codifica a proteína de fusão SP0785-SP1500-Rhavi:

ATGTTTCGCCAACCGAGCCAGACTGCGTTGAAAGATGAGCCGACC
CATCTGGTTGTTGCGAAAGAGGGCAGCGTGGCATCGAGCGTGCT
GCTGAGCGGTACGGTTACTGCCAAAAACGAACAATACGTGTACTT
CGATGCTAGCAAGGGTGATCTGGATGAAATTCTGGTGAGCGTGG
GTGACAAAGTTAGCGAAGGCCAGGCACTGGTGAAGTATTCATCCT
CCGAGGCACAGGCAGCGTACGACAGCGCAAGCCGCGCAGTGGC
GCGTGCCGACCGTCACATTAACGAATTGAACCAAGCGCGTAACGA
GGCCGCAAGCGCGCCAGCACCGCAGCTGCCGGCTCCGGTGGGT
GGCGAAGATGCGACGGTGCAGAGCCCGACCCCGGTTGCGGGTA
ATTCGGTCGCCAGCATCGATGCGCAGCTGGGTGACGCGCGTGAT
GCCCGTGCGGATGCGGCTGCTCAACTGAGCAAGGCTCAGAGCCA
ACTGGACGCGACGACGGTGCTGAGCACCTTGGAGGGTACCGTTG
TCGAAGTCAACAGCAATGTGAGCAAGAGCCCAACGGGTGCGAGC
CAGGTTATGGTCCACATTGTGAGCAATGAAAACTTACAGGTCAAG
GGTGAGCTGAGCGAGTATAACCTGGCGAATCTGAGCGTTGGTCA
AGAGGTCAGCTTTACCAGCAAGGTCTACCCGGATAAGAAATGGAC
CGGCAAGTTGAGCTACATCAGCGACTACCCGAAGAACAATGGCG

AGGCAGCCTCCCCGGCAGCCGGCAACAATACCGGCTCTAAGTAT
CCGTACACCATCGACGTAACCGGTGAGGTCGGCGACCTGAAACA
GGGTTTTAGCGTGAATATCGAAGTGAAGTCCAAGACCAAGGCAAT
TTTGGTTCCGGTTAGCTCCCTGGTGATGGACGATAGCAAGAATTA
TGTGTGGATTGTCGACGAGCAACAGAAAGCGAAAAAAGTTGAAGT
GAGCCTGGGCAATGCTGATGCCGAGAACCAAGAAATCACGTCTG
GTCTGACCAACGGTGCGAAAGTTATTAGCAACCCGACCAGCAGCC
TGGAAGAGGGTAAAGAGGTCAAAGCCGACGAAGCTACGAACACC
AGCGGCGACAATTGGTCCAAATACCAGAGCAACAAGAGCATCACG
ATCGGCTTCGACAGCACTTTTGTGCCGATGGGTTTCGCGCAAAAA
GACGGTAGCTACGCGGGTTTCGATATTGACCTGGCGACCGCTGT
CTTTGAGAAATACGGCATTACGGTTAATTGGCAGCCGATTGATTG
GGACCTGAAAGAGGCCGAACTCACCAAAGGCACCATCGACCTGA
TCTGGAATGGTTACTCCGCAACCGATGAGCGTCGCGAAAAAGTTG
CCTTCAGCAACAGCTATATGAAGAATGAACAAGTGTTGGTAACCAA
GAAATCTAGCGGCATTACGACCGCGAAAGACATGACCGGTAAGAC
GCTGGGTGCGCAGGCCGGTAGCTCTGGCTATGCGGATTTCGAGG
CGAATCCTGAGATTCTGAAAAACATCGTTGCGAATAAAGAGGCGA
ACCAGTACCAGACCTTTAACGAAGCACTGATCGACCTGAAAAACG
ATCGCATTGACGGTCTGCTGATCGATCGTGTGTACGCGAACTATT
ATCTGGAAGCCGAGGGCGTTCTGAACGATTATAATGTTTTTACCGT
GGGTCTGGAGACTGAGGCATTCGCGGTTGGTGCGCGCAAGGAAG
ATACCAACCTGGTTAAAAAGATTAATGAGGCATTTAGCTCACTGTA
CAAGGACGGCAAGTTCCAAGAAATTAGCCAGAAGTGGTTCGGTGA
AGATGTTGCGACGAAAGAGGTTAAAGAGGGCCAATTCGACGCATC
CAACTTTAAAGACTTTAGCAGCATCGCGTCCGCAAGCTCTAGCTG
GCAGAATCAATCTGGTAGCACCATGATTATCCAAGTGGACAGCTT
TGGTAACGTCAGCGGTCAATATGTTAATCGTGCACAGGGTACGGG
TTGTCAGAATTCTCCGTACCCGCTGACCGGTCGTGTTAACGGCAC
GTTCATCGCTTTCAGCGTCGGTTGGAACAATTCTACTGAAAATTGC

AACAGCGCGACCGGTTGGACGGGCTATGCACAAGTGAATGGCAA
TAACACCGAAATCGTCACGTCCTGGAATCTGGCGTATGAGGGTGG
CAGCGGTCCGGCTATTGAACAGGGCCAGGATACCTTCCAATACGT
CCCTACGACCGAGAATAAGTCCCTTCTGAAAGAC

[276] SEQ ID NO: 33, sequência de ácido nucleico otimizada por códon que codifica a proteína de fusão CP1 Rhavi-ligante (GGGGSSS)-SP1500-ligante (AAA)-SP0785:

ATGTTCGACGCATCCAACTTTAAAGACTTTAGCAGCATCGCGTCC
GCAAGCTCTAGCTGGCAGAATCAATCTGGTAGCACCATGATTATC
CAAGTGGACAGCTTTGGTAACGTCAGCGGTCAATATGTTAATCGT
GCACAGGGTACGGGTTGTCAGAATTCTCCGTACCCGCTGACCGG
TCGTGTTAACGGCACGTTCATCGCTTTCAGCGTCGGTTGGAACAA
TTCTACTGAAAATTGCAACAGCGCGACCGGTTGGACGGGCTATGC
ACAAGTGAATGGCAATAACACCGAAATCGTCACGTCCTGGAATCT
GGCGTATGAGGGTGGCAGCGGTCCGGCTATTGAACAGGGCCAG
GATACCTTCCAATACGTCCCTACGACCGAGAATAAGTCCCTTCTG
AAAGACGGCGGTGGCGGTTCGAGCTCGACCAGCGGCGACAATTG
GTCCAAATACCAGAGCAACAAGAGCATCACGATCGGCTTCGACAG
CACTTTTGTGCCGATGGGTTTCGCGCAAAAAGACGGTAGCTACGC
GGGTTTCGATATTGACCTGGCGACCGCTGTCTTTGAGAAATACGG
CATTACGGTTAATTGGCAGCCGATTGATTGGGACCTGAAAGAGGC
CGAACTCACCAAAGGCACCATCGACCTGATCTGGAATGGTTACTC
CGCAACCGATGAGCGTCGCGAAAAAGTTGCCTTCAGCAACAGCTA
TATGAAGAATGAACAAGTGTTGGTAACCAAGAAATCTAGCGGCATT
ACGACCGCGAAAGACATGACCGGTAAGACGCTGGGTGCGCAGGC
CGGTAGCTCTGGCTATGCGGATTTCGAGGCGAATCCTGAGATTCT
GAAAAACATCGTTGCGAATAAAGAGGCGAACCAGTACCAGACCTT
TAACGAAGCACTGATCGACCTGAAAAACGATCGCATTGACGGTCT
GCTGATCGATCGTGTGTACGCGAACTATTATCTGGAAGCCGAGGG
CGTTCTGAACGATTATAATGTTTTTACCGTGGGTCTGGAGACTGAG

GCATTCGCGGTTGGTGCGCGCAAGGAAGATACCAACCTGGTTAAA
AAGATTAATGAGGCATTTAGCTCACTGTACAAGGACGGCAAGTTC
CAAGAAATTAGCCAGAAGTGGTTCGGTGAAGATGTTGCGACGAAA
GAGGTTAAAGAGGGCCAAGCGGCCGCATTTCGCCAACCGAGCCA
GACTGCGTTGAAAGATGAGCCGACCCATCTGGTTGTTGCGAAAGA
GGGCAGCGTGGCATCGAGCGTGCTGCTGAGCGGTACGGTTACTG
CCAAAAACGAACAATACGTGTACTTCGATGCTAGCAAGGGTGATC
TGGATGAAATTCTGGTGAGCGTGGGTGACAAAGTTAGCGAAGGC
CAGGCACTGGTGAAGTATTCATCCTCCGAGGCACAGGCAGCGTA
CGACAGCGCAAGCCGCGCAGTGGCGCGTGCCGACCGTCACATTA
ACGAATTGAACCAAGCGCGTAACGAGGCCGCAAGCGCGCCAGCA
CCGCAGCTGCCGGCTCCGGTGGGTGGCGAAGATGCGACGGTGC
AGAGCCCGACCCCGGTTGCGGGTAATTCGGTCGCCAGCATCGAT
GCGCAGCTGGGTGACGCGCGTGATGCCCGTGCGGATGCGGCTG
CTCAACTGAGCAAGGCTCAGAGCCAACTGGACGCGACGACGGTG
CTGAGCACCTTGGAGGGTACCGTTGTCGAAGTCAACAGCAATGTG
AGCAAGAGCCCAACGGGTGCGAGCCAGGTTATGGTCCACATTGT
GAGCAATGAAAACTTACAGGTCAAGGGTGAGCTGAGCGAGTATAA
CCTGGCGAATCTGAGCGTTGGTCAAGAGGTCAGCTTTACCAGCAA
GGTCTACCCGGATAAGAAATGGACCGGCAAGTTGAGCTACATCAG
CGACTACCCGAAGAACAATGGCGAGGCAGCCTCCCCGGCAGCCG
GCAACAATACCGGCTCTAAGTATCCGTACACCATCGACGTAACCG
GTGAGGTCGGCGACCTGAAACAGGGTTTTAGCGTGAATATCGAAG
TGAAGTCCAAGACCAAGGCAATTTTGGTTCCGGTTAGCTCCCTGG
TGATGGACGATAGCAAGAATTATGTGTGGATTGTCGACGAGCAAC
AGAAAGCGAAAAAAGTTGAAGTGAGCCTGGGCAATGCTGATGCC
GAGAACCAAGAAATCACGTCTGGTCTGACCAACGGTGCGAAAGTT
ATTAGCAACCCGACCAGCAGCCTGGAAGAGGGTAAAGAGGTCAA
AGCCGACGAAGCTACGAAC

[277] SEQ ID NO: 34, sequência de ácido nucleico otimizada por

códon que codifica a proteína de fusão Rhavi-ligante (GGGGSSS)-SP0785-ligante (AAA)-SP1500:

ATGTTCGACGCATCCAACTTTAAAGACTTTAGCAGCATCGCGTCC
GCAAGCTCTAGCTGGCAGAATCAATCTGGTAGCACCATGATTATC
CAAGTGGACAGCTTTGGTAACGTCAGCGGTCAATATGTTAATCGT
GCACAGGGTACGGGTTGTCAGAATTCTCCGTACCCGCTGACCGG
TCGTGTTAACGGCACGTTCATCGCTTTCAGCGTCGGTTGGAACAA
TTCTACTGAAAATTGCAACAGCGCGACCGGTTGGACGGGCTATGC
ACAAGTGAATGGCAATAACACCGAAATCGTCACGTCCTGGAATCT
GGCGTATGAGGGTGGCAGCGGTCCGGCTATTGAACAGGGCCAG
GATACCTTCCAATACGTCCCTACGACCGAGAATAAGTCCCTTCTG
AAAGACGGCGGTGGCGGTTCGAGCTCGTTTCGCCAACCGAGCCA
GACTGCGTTGAAAGATGAGCCGACCCATCTGGTTGTTGCGAAAGA
GGGCAGCGTGGCATCGAGCGTGCTGCTGAGCGGTACGGTTACTG
CCAAAAACGAACAATACGTGTACTTCGATGCTAGCAAGGGTGATC
TGGATGAAATTCTGGTGAGCGTGGGTGACAAAGTTAGCGAAGGC
CAGGCACTGGTGAAGTATTCATCCTCCGAGGCACAGGCAGCGTA
CGACAGCGCAAGCCGCGCAGTGGCGCGTGCCGACCGTCACATTA
ACGAATTGAACCAAGCGCGTAACGAGGCCGCAAGCGCGCCAGCA
CCGCAGCTGCCGGCTCCGGTGGGTGGCGAAGATGCGACGGTGC
AGAGCCCGACCCCGGTTGCGGGTAATTCGGTCGCCAGCATCGAT
GCGCAGCTGGGTGACGCGCGTGATGCCCGTGCGGATGCGGCTG
CTCAACTGAGCAAGGCTCAGAGCCAACTGGACGCGACGACGGTG
CTGAGCACCTTGGAGGGTACCGTTGTCGAAGTCAACAGCAATGTG
AGCAAGAGCCCAACGGGTGCGAGCCAGGTTATGGTCCACATTGT
GAGCAATGAAAACTTACAGGTCAAGGGTGAGCTGAGCGAGTATAA
CCTGGCGAATCTGAGCGTTGGTCAAGAGGTCAGCTTTACCAGCAA
GGTCTACCCGGATAAGAAATGGACCGGCAAGTTGAGCTACATCAG
CGACTACCCGAAGAACAATGGCGAGGCAGCCTCCCCGGCAGCCG
GCAACAATACCGGCTCTAAGTATCCGTACACCATCGACGTAACCG

GTGAGGTCGGCGACCTGAAACAGGGTTTTAGCGTGAATATCGAAG
TGAAGTCCAAGACCAAGGCAATTTTGGTTCCGGTTAGCTCCCTGG
TGATGGACGATAGCAAGAATTATGTGTGGATTGTCGACGAGCAAC
AGAAAGCGAAAAAAGTTGAAGTGAGCCTGGGCAATGCTGATGCC
GAGAACCAAGAAATCACGTCTGGTCTGACCAACGGTGCGAAAGTT
ATTAGCAACCCGACCAGCAGCCTGGAAGAGGGTAAAGAGGTCAA
AGCCGACGAAGCTACGAACCGGCCGCAACCAGCGGCGACAATTG
GTCCAAATACCAGAGCAACAAGAGCATCACGATCGGCTTCGACAG
CACTTTTGTGCCGATGGGTTTCGCGCAAAAAGACGGTAGCTACGC
GGGTTTCGATATTGACCTGGCGACCGCTGTCTTTGAGAAATACGG
CATTACGGTTAATTGGCAGCCGATTGATTGGGACCTGAAAGAGGC
CGAACTCACCAAAGGCACCATCGACCTGATCTGGAATGGTTACTC
CGCAACCGATGAGCGTCGCGAAAAAGTTGCCTTCAGCAACAGCTA
TATGAAGAATGAACAAGTGTTGGTAACCAAGAAATCTAGCGGCATT
ACGACCGCGAAAGACATGACCGGTAAGACGCTGGGTGCGCAGGC
CGGTAGCTCTGGCTATGCGGATTTCGAGGCGAATCCTGAGATTCT
GAAAAACATCGTTGCGAATAAAGAGGCGAACCAGTACCAGACCTT
TAACGAAGCACTGATCGACCTGAAAAACGATCGCATTGACGGTCT
GCTGATCGATCGTGTGTACGCGAACTATTATCTGGAAGCCGAGGG
CGTTCTGAACGATTATAATGTTTTTACCGTGGGTCTGGAGACTGAG
GCATTCGCGGTTGGTGCGCGCAAGGAAGATACCAACCTGGTTAAA
AAGATTAATGAGGCATTTAGCTCACTGTACAAGGACGGCAAGTTC
CAAGAAATTAGCCAGAAGTGGTTCGGTGAAGATGTTGCGACGAAA
GAGGTTAAAGAGGGCCAA

[278] SEQ ID NO: 35, sequência de ácido nucleico otimizada por códon que codifica a proteína de fusão SP1500-ligante (GGGGSSS)-SP0785-ligante (AAA)-Rhavi:

ATGACCAGCGGCGACAATTGGTCCAAATACCAGAGCAACAAGAGC
ATCACGATCGGCTTCGACAGCACTTTTGTGCCGATGGGTTTCGCG
CAAAAAGACGGTAGCTACGCGGGTTTCGATATTGACCTGGCGACC

GCTGTCTTTGAGAAATACGGCATTACGGTTAATTGGCAGCCGATT
GATTGGGACCTGAAAGAGGCCGAACTCACCAAAGGCACCATCGA
CCTGATCTGGAATGGTTACTCCGCAACCGATGAGCGTCGCGAAAA
AGTTGCCTTCAGCAACAGCTATATGAAGAATGAACAAGTGTTGGTA
ACCAAGAAATCTAGCGGCATTACGACCGCGAAAGACATGACCGGT
AAGACGCTGGGTGCGCAGGCCGGTAGCTCTGGCTATGCGGATTT
CGAGGCGAATCCTGAGATTCTGAAAAACATCGTTGCGAATAAAGA
GGCGAACCAGTACCAGACCTTTAACGAAGCACTGATCGACCTGAA
AAACGATCGCATTGACGGTCTGCTGATCGATCGTGTGTACGCGAA
CTATTATCTGGAAGCCGAGGGCGTTCTGAACGATTATAATGTTTTT
ACCGTGGGTCTGGAGACTGAGGCATTCGCGGTTGGTGCGCGCAA
GGAAGATACCAACCTGGTTAAAAAGATTAATGAGGCATTTAGCTCA
CTGTACAAGGACGGCAAGTTCCAAGAAATTAGCCAGAAGTGGTTC
GGTGAAGATGTTGCGACGAAAGAGGTTAAAGAGGGCCAAGGCGG
TGGCGGTTCGAGCTCGTTTCGCCAACCGAGCCAGACTGCGTTGA
AAGATGAGCCGACCCATCTGGTTGTTGCGAAAGAGGGCAGCGTG
GCATCGAGCGTGCTGCTGAGCGGTACGGTTACTGCCAAAAACGA
ACAATACGTGTACTTCGATGCTAGCAAGGGTGATCTGGATGAAAT
TCTGGTGAGCGTGGGTGACAAAGTTAGCGAAGGCCAGGCACTGG
TGAAGTATTCATCCTCCGAGGCACAGGCAGCGTACGACAGCGCA
AGCCGCGCAGTGGCGCGTGCCGACCGTCACATTAACGAATTGAA
CCAAGCGCGTAACGAGGCCGCAAGCGCGCCAGCACCGCAGCTG
CCGGCTCCGGTGGGTGGCGAAGATGCGACGGTGCAGAGCCCGA
CCCCGGTTGCGGGTAATTCGGTCGCCAGCATCGATGCGCAGCTG
GGTGACGCGCGTGATGCCCGTGCGGATGCGGCTGCTCAACTGAG
CAAGGCTCAGAGCCAACTGGACGCGACGACGGTGCTGAGCACCT
TGGAGGGTACCGTTGTCGAAGTCAACAGCAATGTGAGCAAGAGC
CCAACGGGTGCGAGCCAGGTTATGGTCCACATTGTGAGCAATGAA
AACTTACAGGTCAAGGGTGAGCTGAGCGAGTATAACCTGGCGAAT
CTGAGCGTTGGTCAAGAGGTCAGCTTTACCAGCAAGGTCTACCCG

GATAAGAAATGGACCGGCAAGTTGAGCTACATCAGCGACTACCCG
AAGAACAATGGCGAGGCAGCCTCCCCGGCAGCCGGCAACAATAC
CGGCTCTAAGTATCCGTACACCATCGACGTAACCGGTGAGGTCG
GCGACCTGAAACAGGGTTTTAGCGTGAATATCGAAGTGAAGTCCA
AGACCAAGGCAATTTTGGTTCCGGTTAGCTCCCTGGTGATGGACG
ATAGCAAGAATTATGTGTGGATTGTCGACGAGCAACAGAAAGCGA
AAAAAGTTGAAGTGAGCCTGGGCAATGCTGATGCCGAGAACCAAG
AAATCACGTCTGGTCTGACCAACGGTGCGAAAGTTATTAGCAACC
CGACCAGCAGCCTGGAAGAGGGTAAAGAGGTCAAAGCCGACGAA
GCTACGAACCGGCCGCATTCGACGCATCCAACTTTAAAGACTTTA
GCAGCATCGCGTCCGCAAGCTCTAGCTGGCAGAATCAATCTGGTA
GCACCATGATTATCCAAGTGGACAGCTTTGGTAACGTCAGCGGTC
AATATGTTAATCGTGCACAGGGTACGGGTTGTCAGAATTCTCCGT
ACCCGCTGACCGGTCGTGTTAACGGCACGTTCATCGCTTTCAGCG
TCGGTTGGAACAATTCTACTGAAAATTGCAACAGCGCGACCGGTT
GGACGGGCTATGCACAAGTGAATGGCAATAACACCGAAATCGTCA
CGTCCTGGAATCTGGCGTATGAGGGTGGCAGCGGTCCGGCTATT
GAACAGGGCCAGGATACCTTCCAATACGTCCCTACGACCGAGAAT
AAGTCCCTTCTGAAAGAC

[279] SEQ ID NO: 36, sequência de ácido nucleico otimizada por códon que codifica a proteína de fusão SP0785-ligante (GGGGSSS)-SP1500-ligante (AAA)-Rhavi:

ATGTTTCGCCAACCGAGCCAGACTGCGTTGAAAGATGAGCCGACC
CATCTGGTTGTTGCGAAAGAGGGCAGCGTGGCATCGAGCGTGCT
GCTGAGCGGTACGGTTACTGCCAAAAACGAACAATACGTGTACTT
CGATGCTAGCAAGGGTGATCTGGATGAAATTCTGGTGAGCGTGG
GTGACAAAGTTAGCGAAGGCCAGGCACTGGTGAAGTATTCATCCT
CCGAGGCACAGGCAGCGTACGACAGCGCAAGCCGCGCAGTGGC
GCGTGCCGACCGTCACATTAACGAATTGAACCAAGCGCGTAACGA
GGCCGCAAGCGCGCCAGCACCGCAGCTGCCGGCTCCGGTGGGT

GGCGAAGATGCGACGGTGCAGAGCCCGACCCCGGTTGCGGGTA
ATTCGGTCGCCAGCATCGATGCGCAGCTGGGTGACGCGCGTGAT
GCCCGTGCGGATGCGGCTGCTCAACTGAGCAAGGCTCAGAGCCA
ACTGGACGCGACGACGGTGCTGAGCACCTTGGAGGGTACCGTTG
TCGAAGTCAACAGCAATGTGAGCAAGAGCCCAACGGGTGCGAGC
CAGGTTATGGTCCACATTGTGAGCAATGAAAACTTACAGGTCAAG
GGTGAGCTGAGCGAGTATAACCTGGCGAATCTGAGCGTTGGTCA
AGAGGTCAGCTTTACCAGCAAGGTCTACCCGGATAAGAAATGGAC
CGGCAAGTTGAGCTACATCAGCGACTACCCGAAGAACAATGGCG
AGGCAGCCTCCCCGGCAGCCGGCAACAATACCGGCTCTAAGTAT
CCGTACACCATCGACGTAACCGGTGAGGTCGGCGACCTGAAACA
GGGTTTTAGCGTGAATATCGAAGTGAAGTCCAAGACCAAGGCAAT
TTTGGTTCCGGTTAGCTCCCTGGTGATGGACGATAGCAAGAATTA
TGTGTGGATTGTCGACGAGCAACAGAAAGCGAAAAAAGTTGAAGT
GAGCCTGGGCAATGCTGATGCCGAGAACCAAGAAATCACGTCTG
GTCTGACCAACGGTGCGAAAGTTATTAGCAACCCGACCAGCAGCC
TGGAAGAGGGTAAAGAGGTCAAAGCCGACGAAGCTACGAACGGC
GGTGGCGGTTCGAGCTCGACCAGCGGCGACAATTGGTCCAAATA
CCAGAGCAACAAGAGCATCACGATCGGCTTCGACAGCACTTTTGT
GCCGATGGGTTTCGCGCAAAAAGACGGTAGCTACGCGGGTTTCG
ATATTGACCTGGCGACCGCTGTCTTTGAGAAATACGGCATTACGG
TTAATTGGCAGCCGATTGATTGGGACCTGAAAGAGGCCGAACTCA
CCAAAGGCACCATCGACCTGATCTGGAATGGTTACTCCGCAACCG
ATGAGCGTCGCGAAAAAGTTGCCTTCAGCAACAGCTATATGAAGA
ATGAACAAGTGTTGGTAACCAAGAAATCTAGCGGCATTACGACCG
CGAAAGACATGACCGGTAAGACGCTGGGTGCGCAGGCCGGTAGC
TCTGGCTATGCGGATTTCGAGGCGAATCCTGAGATTCTGAAAAAC
ATCGTTGCGAATAAAGAGGCGAACCAGTACCAGACCTTTAACGAA
GCACTGATCGACCTGAAAAACGATCGCATTGACGGTCTGCTGATC
GATCGTGTGTACGCGAACTATTATCTGGAAGCCGAGGGCGTTCTG

AACGATTATAATGTTTTTACCGTGGGTCTGGAGACTGAGGCATTC
GCGGTTGGTGCGCGCAAGGAAGATACCAACCTGGTTAAAAAGATT
AATGAGGCATTTAGCTCACTGTACAAGGACGGCAAGTTCCAAGAA
ATTAGCCAGAAGTGGTTCGGTGAAGATGTTGCGACGAAAGAGGTT
AAAGAGGGCCAACGGCCGCATTCGACGCATCCAACTTTAAAGACT
TTAGCAGCATCGCGTCCGCAAGCTCTAGCTGGCAGAATCAATCTG
GTAGCACCATGATTATCCAAGTGGACAGCTTTGGTAACGTCAGCG
GTCAATATGTTAATCGTGCACAGGGTACGGGTTGTCAGAATTCTC
CGTACCCGCTGACCGGTCGTGTTAACGGCACGTTCATCGCTTTCA
GCGTCGGTTGGAACAATTCTACTGAAAATTGCAACAGCGCGACCG
GTTGGACGGGCTATGCACAAGTGAATGGCAATAACACCGAAATCG
TCACGTCCTGGAATCTGGCGTATGAGGGTGGCAGCGGTCCGGCT
ATTGAACAGGGCCAGGATACCTTCCAATACGTCCCTACGACCGAG
AATAAGTCCCTTCTGAAAGAC

[280] SEQ ID NO:37, sequência de ligante [7 aminoácidos]:
GGGGSSS

[281] SEQ ID NO: 38, sequência de ligante [3 aminoácidos]:
AAA

[282] SEQ ID NO: 39, sequência de ligante [5 repetições de aminoácidos]:
$(GGGGS)_n$

[283] SEQ ID NO: 40, sequência de ligante [6 aminoácidos]:
GGGGGG

[284] SEQ ID NO: 41, sequência de ligante [15 aminoácidos]:
GGGGSGGGGSGGGGS

[285] SEQ ID NO: 42, sequência de ligante [30 aminoácidos]:
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

[286] SEQ ID NO: 43, sequência de ligação [18 aminoácidos]:
KESGSVSSEQLAQFRSLD

[287] SEQ ID NO: 44, sequência de ligante [14 aminoácidos]:

EGKSSGSGSESKST

[288] SEQ ID NO: 45, sequência de ligante:

$(Gly)_n$

[289] SEQ ID NO: 46, sequência de ligante [8 aminoácidos]:

GGGGGGGG

[290] SEQ ID NO: 47, sequência de ligante [12 aminoácidos]:

GSAGSAAGSGEF

[291] SEQ ID NO: 48, sequência de ligante [5 repetições de aminoácidos]:

$(EAAAK)_n$

[292] SEQ ID NO: 49, sequência de ligante:

$A(EAAAK)_nA$

[293] SEQ ID NO: 50, sequência de ligante:

$A(EAAAK)_4ALEA(EAAAK)_4A$

[294] SEQ ID NO: 51, sequência de ligante:

$[A(EAAAK)_nA]_m$

[295] SEQ ID NO: 52, sequência de ligante [12 aminoácidos]:

AEAAAKEAAAKA

[296] SEQ ID NO: 53, sequência de ligante [2 repetições de aminoácidos]:

$(XP)_n$

[297] SEQ ID NO: 54, sequência de ligante:

$(AP)_n$

[298] SEQ ID NO: 55, sequência de ligante:

$(KP)_n$

[299] SEQ ID NO: 56, sequência de ligante:

$(QP)_n$

[300] SEQ ID NO: 57, sequência de ligante [14 aminoácidos]:

APAPAPAPAPAPAP

[301] SEQ ID NO: 58, sequência ligante GAG [21 aminoácidos]:

GAPGGGGGAAAAAGGGGGGAP

[302] SEQ ID NO: 59, sequência de ligante GAG2 [39 aminoácidos]:

GAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAP

[303] SEQ ID NO: 60, sequência de ligante GAG3 [57 aminoácidos]:

GAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAP GGGGGAAAAAGGGGGGAP

Referências

Anttila M, Eskola J, Ahman H, Käyhty H. Avidity of IgG for *Streptococcus pneumoniae* type 6B and 23F polysaccharides in infants primed with pneumococcal conjugates and boosted with polysaccharide or conjugate vaccines. J Infect Dis. 1998 Jun;177(6):1614-21.

Ausubel FM *et al*. 1995. Current Protocols in Molecular Biology, N.Y., John Wiley & Sons.

Berry, A. M. *et al*. (1995) Infection and Immunity 63: 1969-74)

Centers for Disease Control and Prevention. Preventing pneumococcal disease among infants and young children. Morbidity and Mortality Weekly Report. 2000;49:1-55.

Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of pneumococcal disease among infants and children — use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine and 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine. Morbidity and Mortality Weekly Report. 2010;59:1-24.

Coligan JE *et al*. 2018. Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, Inc.

Daniels, C. C. *et al*. (2010) Infection and Immunity 7S:2163-72

Davis *et al*. 1986. Basic Methods in Molecular Biology, Elsevir Sciences Publishing, Inc., New York.

Douce *et al*. Mutants of *Escherichia coli* heat-labile toxin lacking ADP-

ribosyltransferase activity act as non-toxic, mucosal adjuvants. PNAS Vol. 92, pp. 1644-1648, February 1995.

Douce *et al*. Genetically detoxified mutants of heat-labile toxin from *Escherichia coli* are able to act as oral adjuvants" Infect Immun. 1999 Sep;67(9):4400-6)

Dracopoli, N *et al*. 2018. Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, Inc.;

Evans JT *et al*. Enhancement of antigen-specific immunity via the TLR-4 ligands MPL adjuvant and Ribi.529. Expert Rev Vaccines 2003 Apr;2(2):219-29.

Ferreira *et al*. "DNA vaccines based on genetically detoxified derivatives of pneumolysin fail to protect mice against challenge with *Streptococcus pneumoniae*" FEMS Immunol Med Microbial (2006) 46: 291-297)

Giuliani MM *et al*. Mucosal adjuvanticity and immunogenicity of LTR72, a novel mutant of Escherichia coli heat-labile enterotoxin with partial knockout of ADP-ribosyltransferase activity. J Exp Med. 1998 Apr 6;187(7):1123-32.

Gruber MF, Pratt D, Haase M. Licensing of pneumococcal conjugate vaccines for children and adults: Regulatory perspective from the European Medicines Agency and the U.S. Food and Drug Administration. In: Siber GR, Klugman KP, Mäkelä PH, eds. Pneumococcal Vaccines: The Impact of Conjugate Vaccine. Washington, DC: ASM Press; 2008;183-96.

Hames *et al*. 1985. Nucleic Acid Hybridization, IL Press.

Helppolainen SH, Nurminen KP, Määttä JA, Halling KK, Slotte JP, Huhtala T, *et al*. Rhizavidin from Rhizobium etli: the first natural dimer in the avidin protein family. Biochem J. 2007;405:397- 405.

Holliger P, Prospero T, Winter G. "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Jul 15;90(14):6444-8.

Ishizaka ST *et al*. “E6020: a synthetic Toll-like receptor 4 agonist as a vaccine adjuvant.” Expert Rev. Vaccines. 2007 Oct; 6(5):773-84.

Kim KH, Yu J, Nahm MH. Efficiency of a pneumococcal opsonophagocytic killing assay improved by multiplexing and by coloring colonies. Clin Diagn Lab Immunol. 2003 Jul; 10(4):616-21.

Kojima K, Ishizaka A, Oshika E, Taguchi Y, Tomizawa K, *et al*. Quantitation of IgG subclass antibodies to pneumococcal capsular polysaccharides by ELISA, using Pneumovax-specific antibodies as a reference. Tohoku J Exp Med. 1990 Jul;161(3):209-15.

Koskela M, Leinonen M. Comparison of ELISA and RIA for measurement of pneumococcal antibodies before and after vaccination with 14-valent pneumococcal capsular polysaccharide vaccine. J Clin Pathol. 1981 Jan;34(1):93-8.

Martin, EW, Ed. Remington’s Pharmaceutical Sciences. 15th ed. Easton, PA: Mack Publishing Company, 1975.

Martinez JE, Romero-Steiner S, Pilishvili T, Barnard S, Schinsky J, *et al*. A flow cytometric opsonophagocytic assay for measurement of functional antibodies elicited after vaccination with the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine. Clin Diagn Lab Immunol. 1999 Jul;6(4):581-6.

Meyers and Miller. CABIOS, 1989, 4:11-17.

Mitchell L. Protective Immune Responses to *Streptococcus pneumoniae* Pneumolysoids, ASM2011 conference abstract, 2011.

Moffitt KL, Malley R, Lu, Y-J. Identification of Protective Pneumococcal Th17 Antigens from the Soluble Fraction of a Killed Whole Cell Vaccine. 2012 PLoS ONE 7(8):e43445.

Munro CS, Stanley PJ, Cole PJ. Assessment of biological activity of immunoglobulin preparations by using opsonized micro-organisms to stimulate neutrophil chemiluminescence. Clin Exp Immunol. 1985 Jul;61(1):183-8.

Ojo-Amaize EA, Church JA, Barka NE, Agopian MS, Peter JB. A rapid and sensitive chemiluminescence assay for evaluation of functional opsonic activity of *Haemophilus influenzae* type b-specific antibodies. Clin Diagn Lab Immunol. 1995 May;2(3):286-90.

Paton J. C. *et al*. "Purification and immunogenicity of genetically obtained pneumolysin toxoids and their conjugation to *Streptococcus pneumoniae* type 19F polysaccharide" Infect Immun 1991 July; 59(7):2297-304

PNEUMOVAX® 23(prescribing information). Whitehouse Station, NJ: Merck & Co.; May 2015.

PREVNAR 13® (prescribing information). New York, NY: Pfizer; August 2017.

Poljak RJ. Production and structure of diabodies. Structure. 1994 Dec 15;2(12):1121-3.

Powell MF and Newman MJ, Eds. 1995. Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach. New York, NY: Plenum Press.

Richter SS, Diekema DJ, Heilmann KP, Dohrn CL, Riahi F, Doern GV. Changes in pneumococcal serotypes and antimicrobial resistance after introduction of the 13 valent conjugate vaccine in the United States. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58:6484-9.

Romero-Steiner S, Libutti D, Pais LB, Dykes J, Anderson P, *et al*. Standardization of an opsonophagocytic assay for the measurement of functional antibody activity against *Streptococcus pneumoniae* using differentiated HL-60 cells. Clin Diagn Lab Immunol. 1997 Jul;4(4):415-22.

Romero-Steiner S, Holder PF, Gomez de Leon P, Spear W, Hennessy TW, *et al*. Avidity determinations for *Haemophilus influenzae* Type b anti-polyribosylribitol phosphate antibodies. Clin Diagn Lab Immunol. 2005 Sep;12(9):1029-35.

Saeland E, Vidarsson G, Jonsdottir I. Pneumococcal pneumonia and bacteremia model in mice for the analysis of protective antibodies.

Microb Pathog. 2000 Aug;29(2):81-91.

Sambrook J *et al*. 1989. Molecular Cloning, a Laboratory Manual. Cold Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Saunders F. K. *et al*. Pneumolysin, the thiol- activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*, does not require a thiol group for *in vitro* activity. Infect Immun 1989 August; 57(8):2547-52).

Singh *et al*. Curr. HIV Res. 2003 1:309-20.

Stack AM, Malley R, Thompson CM, Kobzik L, Siber GR, *et al*. Minimum protective serum concentrations of pneumococcal anti-capsular antibodies in infant rats. J Infect Dis. 1998 Apr;177(4):986-90.

Williams *et al*, Innate imprinting by the modified heat-labile toxin of *Escherichia coli* (LTK63) provides generic protection against lung infectious disease. The Journal of Immunology 2004 173:7435-7443.

Wu W, Huang J, Duan B, Traficante DC, Hong H, *et al*. Th17-stimulating protein vaccines confer protection against *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. Am J Respir Crit Care Med. 2012 Sep 1;186(5):420-7.

Zhang F, Lu YJ, Malley R. Multiple antigen-presenting system (MAPS) to induce comprehensive B- and T-cell immunity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110:13564-9.

WO2012/155007

WO 2012/155053

US 2009/0285846

Equivalentes

[304] Os versados na técnica reconhecerão, ou serão capazes de confirmar usando não mais que experimentação de rotina, muitos equivalentes às modalidades específicas da invenção descritas no presente documento. O escopo da presente invenção não se destina a ser limitado à Descrição acima, mas sim conforme estabelecido nas seguintes reivindicações:

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína de fusão, caracterizada pelo fato de que compreende:

(i) uma porção de ligação à biotina;

(ii) um polipeptídeo ou fragmento SP1500; e

(iii) um polipeptídeo ou fragmento SP0785.

2. Proteína de fusão, caracterizada pelo fato de que compreende:

(i) uma porção de ligação à biotina compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 80%, 85%, 90% idêntica à SEQ ID NO: 2 ou uma porção de ligação à biotina da mesma;

(ii) um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 80%, 85%, 90% idêntica à SEQ ID NO: 7 ou uma porção antigênica da mesma; e

(iii) um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 80%, 85%, 90% idêntica à SEQ ID NO: 4 ou uma porção antigênica da mesma.

3. Proteína de fusão, caracterizada pelo fato de que compreende:

(i) uma porção de ligação à biotina compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 80%, 85%, 90% idêntica à SEQ ID NO: 2 ou uma porção de ligação à biotina da mesma;

(ii) um primeiro polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 80%, 85%, 90% idêntica à SEQ ID NO: 7 ou uma porção antigênica da mesma;

(iii) um segundo polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 80%, 85%, 90% idêntica à SEQ ID NO: 4 ou uma porção antigênica da mesma; e

(iv) um primeiro ligante posicionado entre a porção de ligação à biotina e o primeiro polipeptídeo e / ou um segundo ligante

posicionado entre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo.

4. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que o primeiro ligante compreende a sequência de aminoácidos GGGGSSS.

5. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 3 ou 4, caracterizada pelo fato de que o segundo ligante compreende a sequência de aminoácidos AAA.

6. Proteína de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que a porção de ligação à biotina é ligada de forma C-terminal ao primeiro polipeptídeo.

7. Proteína de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que a porção de ligação à biotina é ligada de forma N-terminal ao primeiro polipeptídeo.

8. Proteína de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que o primeiro polipeptídeo é ligado de forma C-terminal ao segundo polipeptídeo.

9. Proteína de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que o primeiro polipeptídeo é ligado de forma N-terminal ao segundo polipeptídeo.

10. Proteína de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizada pelo fato de que o segundo polipeptídeo é ligado de forma C-terminal à porção de ligação à biotina.

11. Proteína de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizada pelo fato de que o segundo polipeptídeo é ligado de forma N-terminal à porção de ligação à biotina.

12. Proteína de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizada pelo fato de que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

13. Proteína de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizada pelo fato de que compreende a

sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

14. Proteína de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizada pelo fato de que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

15. Proteína de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizada pelo fato de que compreende a sequência de aminoácidos pelo menos 80%, 85%, 90% idêntica à SEQ ID NO: 23.

16. Proteína de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizada pelo fato de que a proteína de fusão é CP1.

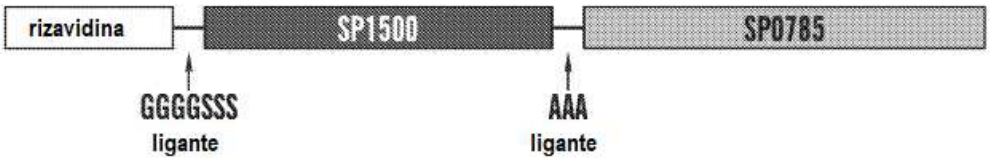


FIG. 1

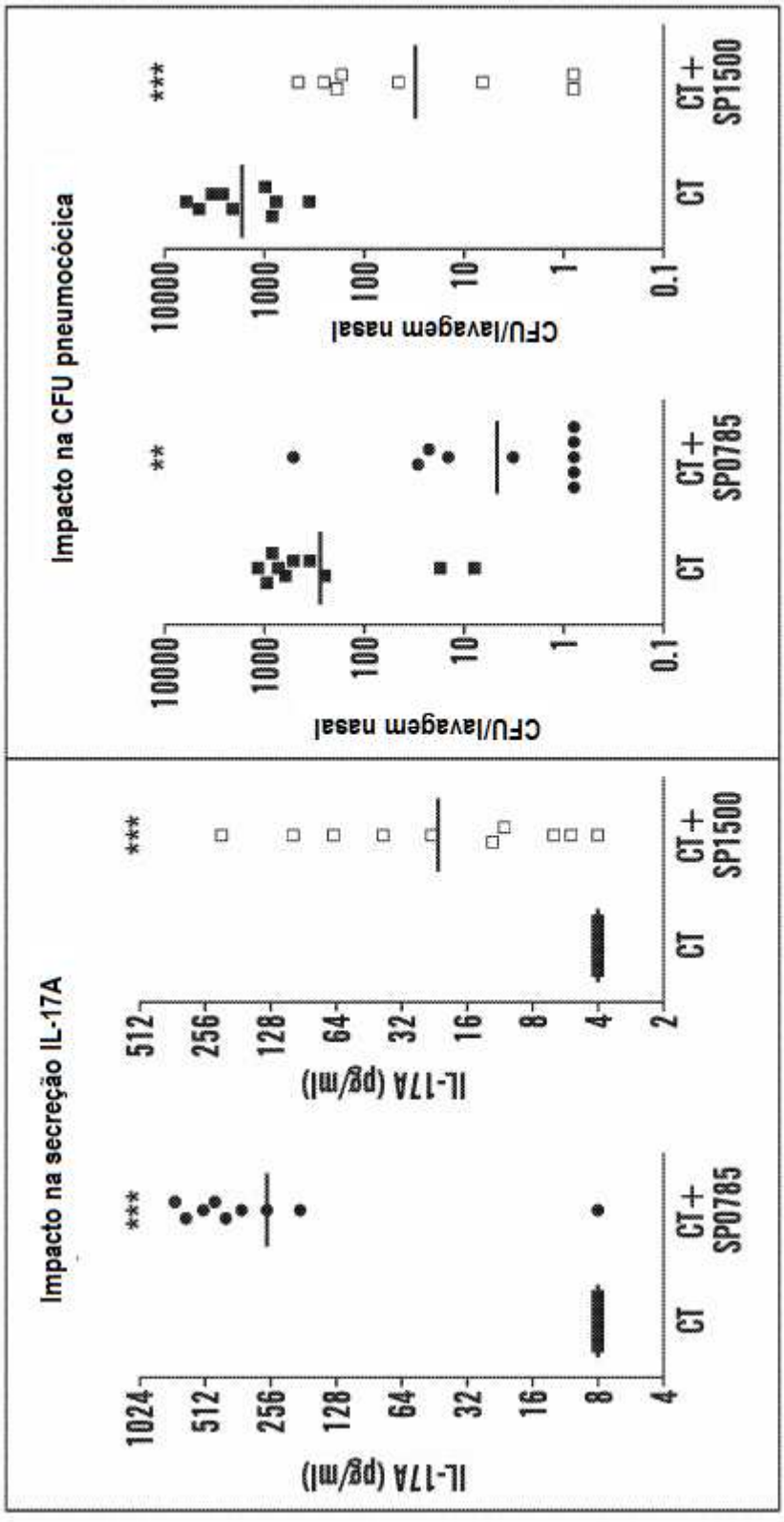

Impacto na secreção IL-17A
IL-17A (pg/ml)
1024
512
256
128
64
32
16
8
4
***
CT
CT+ SP0785
IL-17A (pg/ml)
512
256
128
64
32
16
8
4
2
***
CT
CT+ SP1500
Impacto na CFU pneumocócica
CFU/lavagem nasal
10000
1000
100
10
1
0.1
**
CT
CT+ SP0785
CFU/lavagem nasal
10000
1000
100
10
1
0.1
***
CT
CT+ SP1500

FIG. 2

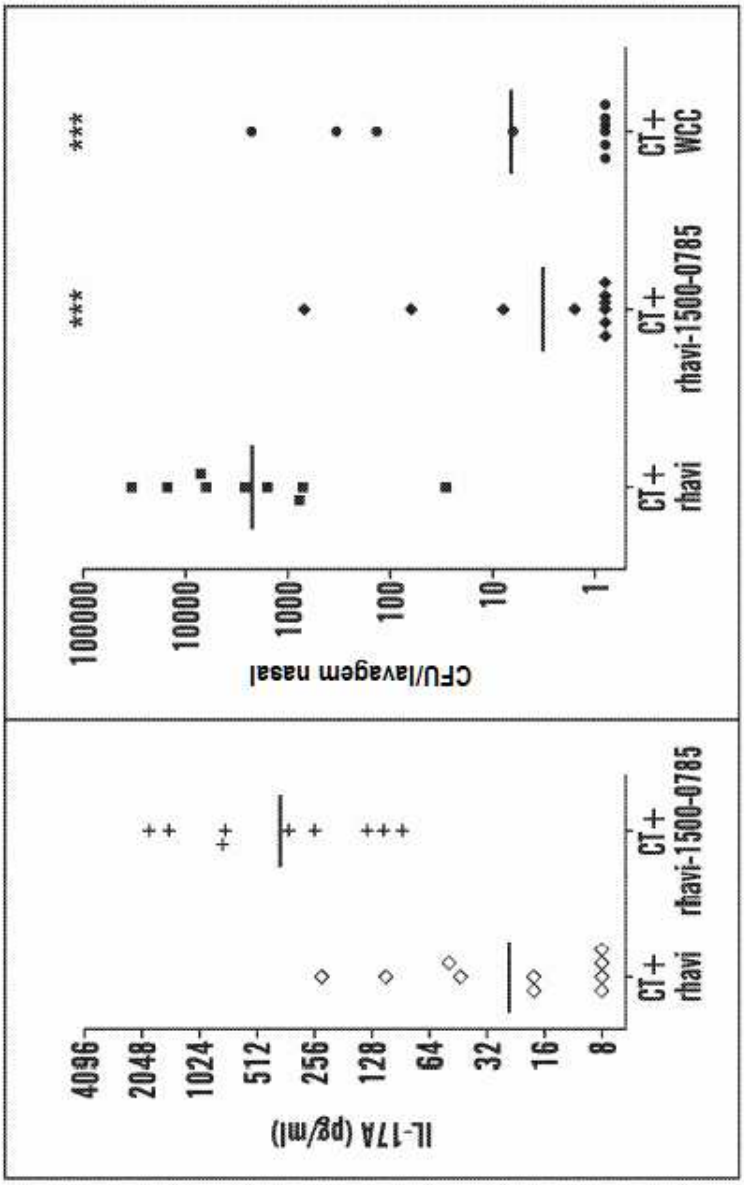

IL-17A (pg/ml)
4096
2048
1024
512
256
128
64
32
16
8
CT+ rhavi
CT+ rhavi-1500-0785
CFU/lavagem nasal
100000
10000
1000
100
10
1
***
***
CT+ rhavi
CT+ rhavi-1500-0785
CT+ WCC

FIG. 3

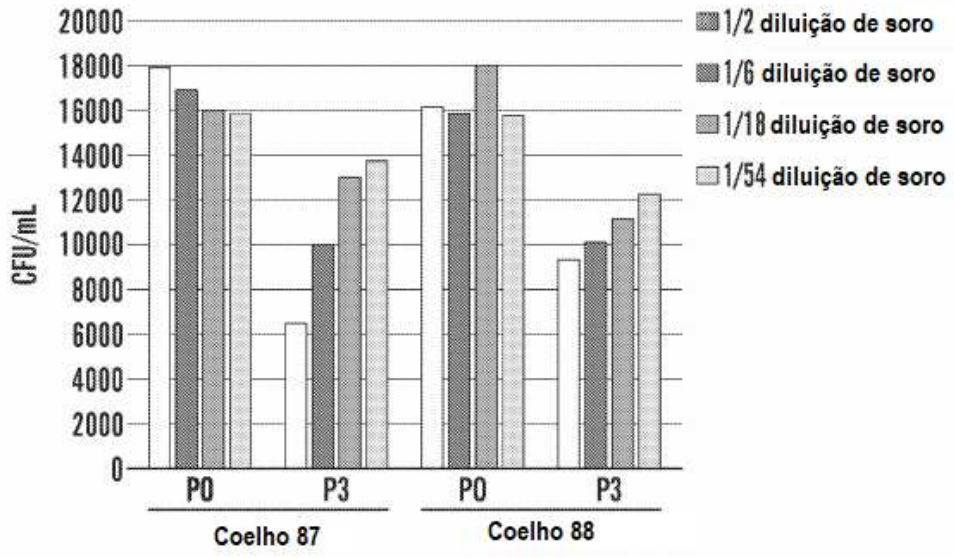

20000
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
CFU/mL
1/2 diluição de soro
1/6 diluição de soro
1/18 diluição de soro
1/54 diluição de soro
P0
P3
P0
P3
Coelho 87
Coelho 88

FIG. 4

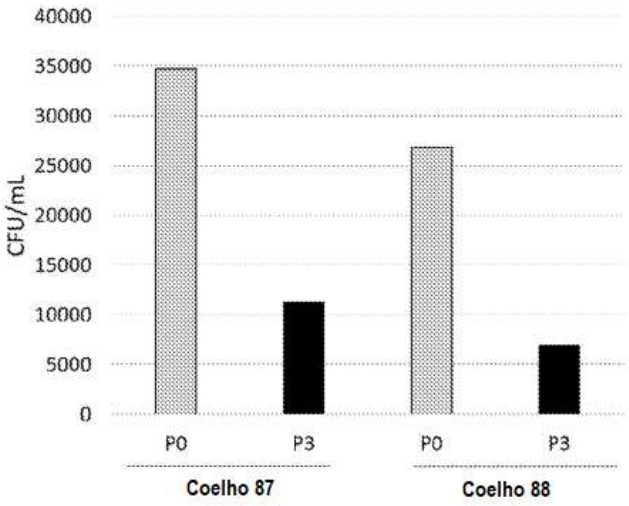

40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
CFU/mL
P0
P3
P0
P3
Coelho 87
Coelho 88

FIG. 5

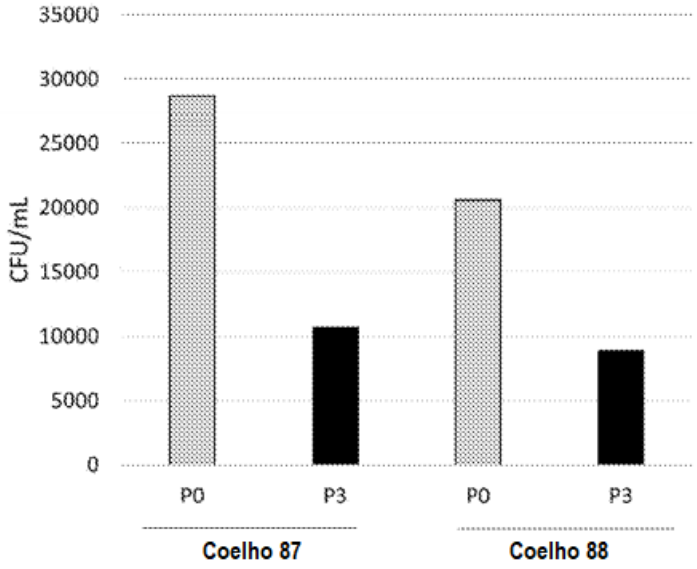

35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
CFU/mL
P0
P3
P0
P3
Coelho 87
Coelho 88

FIG. 6

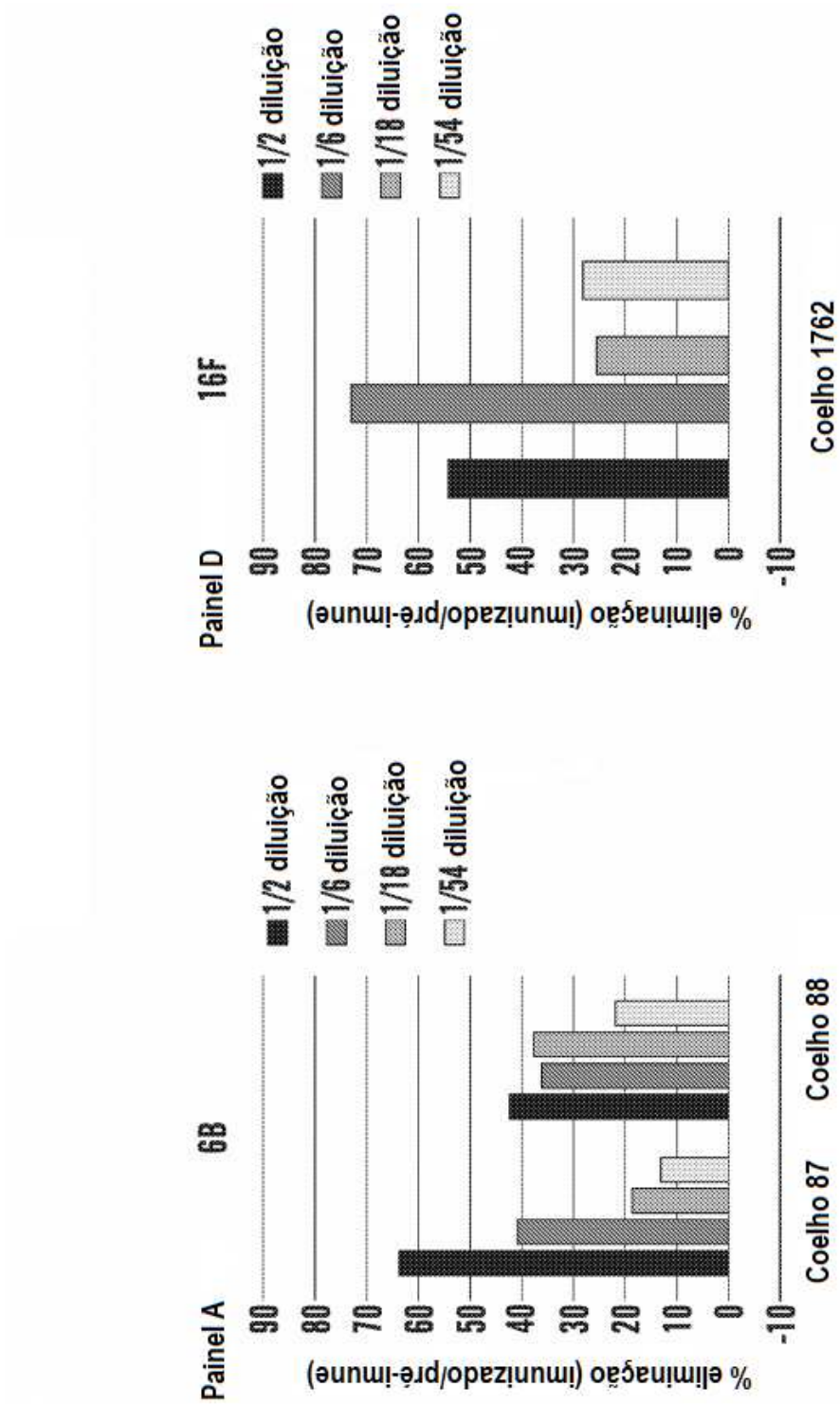

Painel A
6B
Painel D
16F
1/2 diluição
1/6 diluição
1/18 diluição
1/54 diluição
% eliminação (imunizado/pré-imune)
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
Coelho 87
Coelho 88
Coelho 1762

FIG. 7

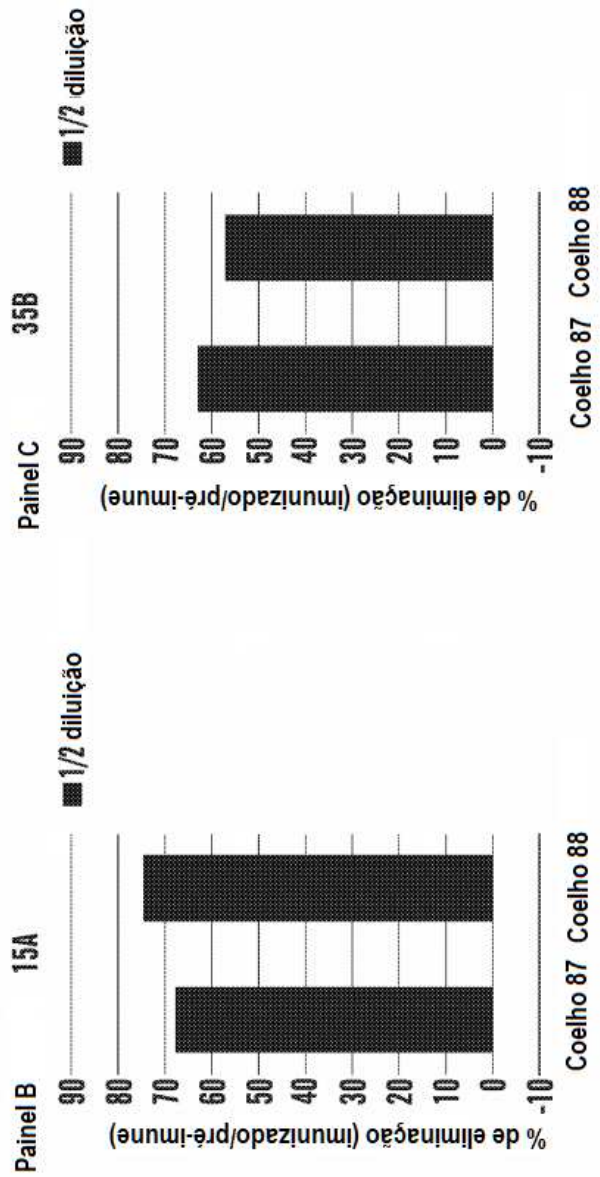

Painel B
15A
1/2 diluição
% de eliminação (imunizado/pré-imune)
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
Coelho 87
Coelho 88
Painel C
35B
1/2 diluição
% de eliminação (imunizado/pré-imune)
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
Coelho 87
Coelho 88

FIG. 7 (cont.)

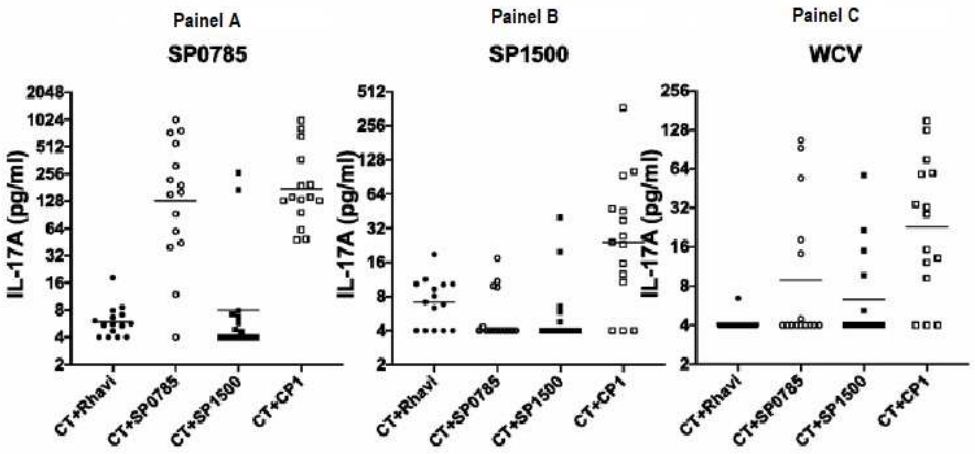

Painel A
SP0785
Painel B
SP1500
Painel C
WCV
IL-17A (pg/ml)
2048
1024
512
256
128
64
32
16
8
4
2
CT+Rhavi
CT+SP0785
CT+SP1500
CT+CP1

FIG. 8

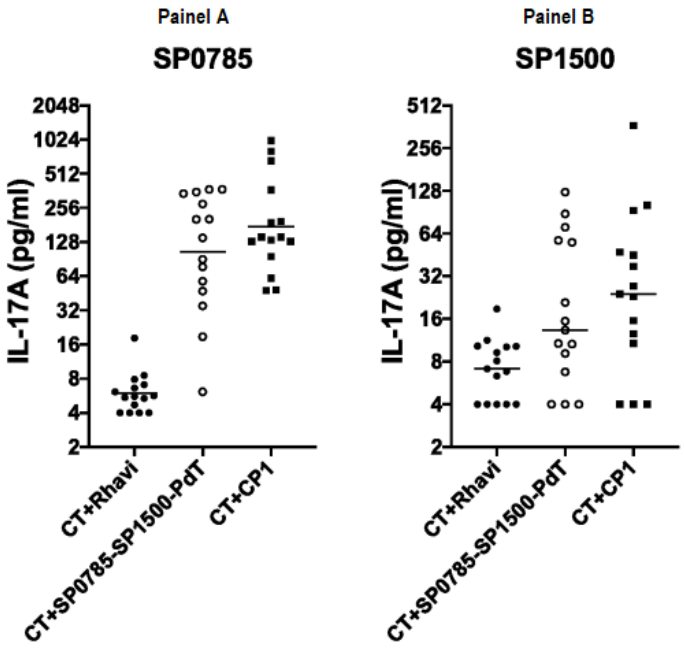

Painel A
SP0785
IL-17A (pg/ml)
2048
1024
512
256
128
64
32
16
8
4
2
CT+Rhavi
CT+SP0785-SP1500-PdT
CT+CP1
Painel B
SP1500
IL-17A (pg/ml)
512
256
128
64
32
16
8
4
2
CT+Rhavi
CT+SP0785-SP1500-PdT
CT+CP1

FIG. 9

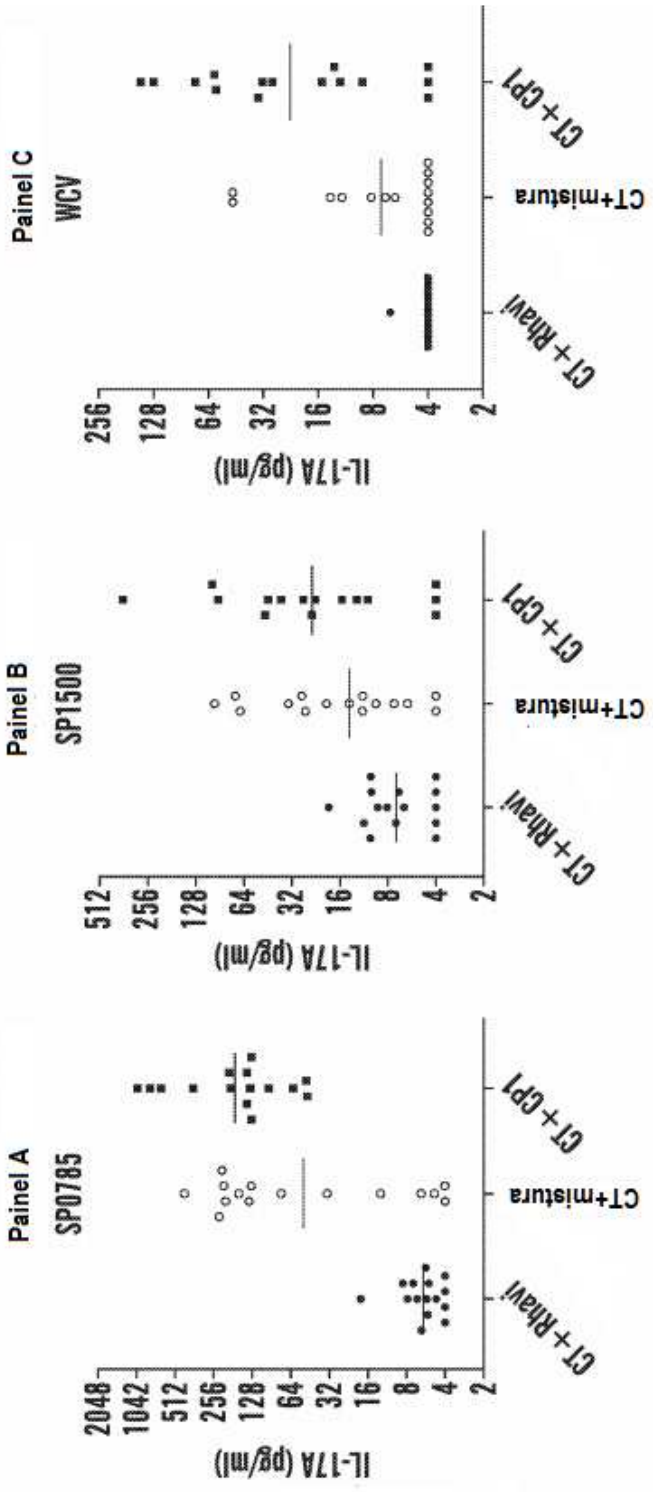

Painel A
SP0785
Painel B
SP1500
Painel C
WCV
IL-17A (pg/ml)
2048
1042
512
256
128
64
32
16
8
4
2
CT+Rhavi
CT+mistura
CT+CPI

FIG. 10

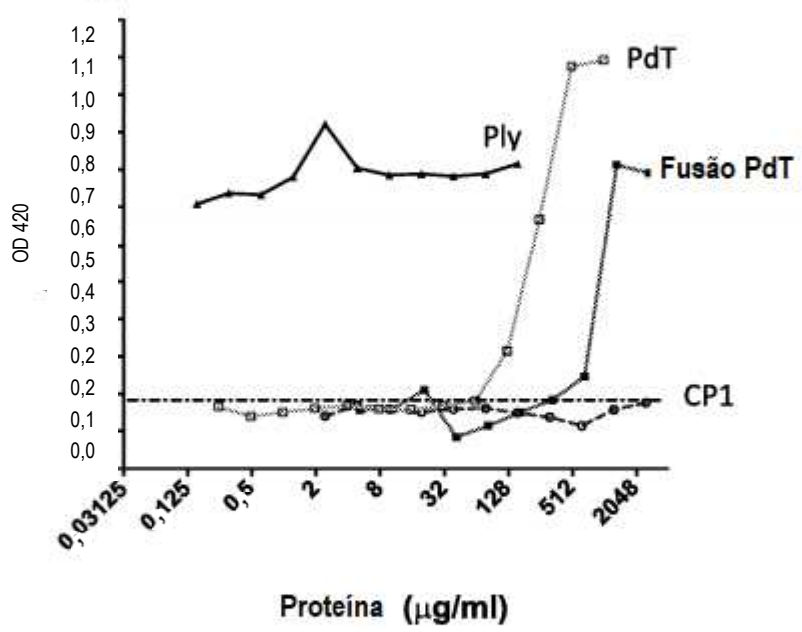

OD 420
1,2
1,1
1,0
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,2
0,1
0,0
PdT
Ply
Fusão PdT
CP1
0,03125
0,125
0,5
2
8
32
128
512
2048
Proteína (μg/ml)

FIG. 11

RESUMO

Patente de Invenção: **“VACINAS DE PROTEÍNA DE FUSÃO PNEUMOCÓCICA”.**

A presente invenção refere-se a tecnologias para a prevenção e / ou tratamento de infecções pneumocócicas.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: LISTAGEM DE SEQUENCIA (JUNTADA) 08-04-2021
- Data de Geração do Código: 09/04/2021
- Hora de Geração do Código: 10:22:04
- Código de Controle:
  - Campo 1: 92717BF23F2F51DD
  - Campo 2: 640C34F9756FA2A7