



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI 0613026-7 A2**

(22) Data de Depósito: 13/07/2006
(43) Data da Publicação: 03/01/2012
(RPI 2139)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 14/31
A61K 39/085
A61P 31/04

(54) Título: COMPOSIÇÃO, FRAGMENTO DE NUCLEOTÍDEO, CONSTRUCTO DE DNA RECOMBINANTE, MÉTODO PARA PRODUZIR PROTEÍNA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E MÉTODO PARA USO DA MESMA, FORMULAÇÃO, MÉTODO DE ADMINISTRAR COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODO DE PREVENÇÃO E CONTROLE DE INFECÇÕES ASSOCIADAS A STAPHYLOCOCCUS

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO, FRAGMENTO DE NUCLEOTÍDEO, CONSTRUCTO DE DNA RECOMBINANTE, MÉTODO PARA PRODUZIR PROTEÍNA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E MÉTODO PARA USO DA MESMA, FORMULAÇÃO, MÉTODO DE ADMINISTRAR COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODO DE PREVENÇÃO E CONTROLE DE INFECÇÕES ASSOCIADAS A STAPHYLOCOCCUS. A presente invenção descreve método de preparação e uso de formulação de vacina de polipetídeo para prevenção e controle de infecções mediadas por Staphylococcus em humanos, bovinos e outros mamíferos, usando tecnologia de DNA recombinante.

(30) Prioridade Unionista: 14/07/2005 IN 940/CHE/2005

(73) Titular(es): Bharat Biotech International Limited

(72) Inventor(es): Kandaswamy Sumathy, Krishna Mohan Vadrevu, Krishna Murthy Ella

(74) Procurador(es): BHERING ADVOGADOS

(86) Pedido Internacional: PCT IN2006000246 de 13/07/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/007352de 18/01/2007

COMPOSIÇÃO, FRAGMENTO DE NUCLEOTÍDEO, CONSTRUCTO DE DNA
RECOMBINANTE, MÉTODO PARA PRODUIR PROTEÍNA, COMPOSIÇÃO
FARMACÊUTICA E MÉTODO PARA USO DA MESMA, FORMULAÇÃO, MÉTODO
DE ADMINISTRAR COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODO DE PREVENÇÃO E
5 CONTROLE DE INFECÇÕES ASSOCIADAS A *STAPHYLOCOCCUS*
 CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se à formulação de polipeptídeos para uso como vacina para a prevenção e controle de infecções estafilocócicas em mamíferos.

10 ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

As bactérias gram-positivas *Staphylococci* normalmente habitando na pele e membranas mucosas em humanos, ganham acesso aos tecidos internos durante ferimentos/cirurgias e causa infecção. A bactéria tem uma propensão característica
15 de invadir a pele e tecidos adjacentes em sítios de dispositivos médicos prostéticos, incluindo catéteres intravasculares, desvios de fluido cerebrospinal, desvios de hemodiálises, enxertos vasculares e lentes de contato de uso prolongados (Lowy 1998, Foster 2004). Os patógenos
20 importantes são coagulase positiva *Staphylococcus aureus* e coagulase negativa *Staphylococcus epidermidis*. Eles causam uma variedade de doenças variando de doenças de pele, infecções de ferimentos, mastites a endocardites, osteomielites, infecções de pulmão crônicas ameaçadoras a
25 vida de seres humanos e animais. Elas são responsáveis por 1-9% dos casos de meningite bacteriana e 10-15% dos casos de abscessos do cérebro (Foster 2004). A mortalidade devido a bacteremia por *Staphylococci* é de aproximadamente 20-50% devido ao aparecimento de resistência a droga incluindo
30 resistência à Meticilina e Vancomicina (Enright 2002, Mongodin 2003). Os *Staphylococci* são a causa principal de infecções nosocomiais (adquiridas em hospital) e adquiridas na comunidade associadas à hospitalização prolongada (Franklin 2003).

35 A virulência do *Staphylococcus* é multifatorial, mediada por um número de fatores de virulência tais como alfa, beta,

gama e delta toxinas, toxina da síndrome do choque tóxico (TSST), enterotoxinas, leucocidina, proteases, estafiloquinase, coagulase e fator de aglomeração (Jin 2004, Martin 2003). Para iniciar a infecção invasiva, o

5 *Staphylococcus* adere ao substrato da matriz extracelular e células eucarióticas por força de proteínas de superfície diferentes ("adesinas") (Peacock 2002). Estas proteínas de superfície produzidas por *Staphylococcus* são designadas como MSCRAMMs (componentes de superfície microbial reconhecendo

10 moléculas de matriz adesiva). Estas proteínas se ligam especificamente a substratos biológicos tais como proteínas de soro, IgG, fibronectina (Fn), fibrinogênio (Fg), vitronectina, trombospondina, deste modo mascarando a bactéria do sistema imune do hospedeiro (Hartford 1999,

15 Harris 2002). Estas proteínas de superfície podem também se ligar ao colágeno, laminina, glicosaminoglicanos e elastina de matrizes celulares extras (Snodgras, 1999) de um tecido ferido ou uma parede de vaso ferida, sialoproteína do osso, se liga a plaquetas (Siboo 2001) e a substratos não-

20 biológicos como dispositivos médicos (catéteres, desvios, marca-passos). Todas estas interações contribuem para a colonização de tecidos hospedeiros, mas a importância de cada uma destas funções de ligação em infecções diferentes ainda é incerta (Theresa 1999).

25 O aparecimento continuado de resistência a antibióticos provocou a necessidade de estratégias alternativas para a prevenção e tratamento de doenças estafilocócicas. A vacinação provou ser relativamente mal sucedida contra das bactérias comensais de mamíferos comuns *Staphylococci*, apesar

30 de quase um século de experiências (Michie 2002). Vários pesquisadores tentaram produzir vacinas para *S.aureus* lisado, fixo, atenuado ou morto e/ou isolar polissacarídeos capsulares ou componentes de paredes celulares, que induzirão a imunidade ao *S.aureus*. Entretanto, nenhuma destas

35 tentativas foi bem sucedida. Toxóides induziram a alta quantidade de anticorpos em vários estudos, mas provaram ser

candidatos a vacinas mal sucedidos já que eles induziram à reações adversas. O desenvolvimento de componentes antigênicos de polissacarídeos da cápsula estafilocócica é complicado pela grande quantidade de cepas predominantes na comunidade. Ali Fattom e outros (1996) (Nabi Pharmaceuticals) desenvolveram uma vacina (Staph VAX) pela ligação de polissacarídeos do tipo 5 e tipo 8 purificados de *S.aureus* a uma proteína portadora (uma forma não-tóxica da exotoxina *Pseudomonas aeruginosa*) e demonstrou 56% de proteção contra o *S.aureus* em pacientes recebendo hemodiálise (Shinefield H. 2002). Como em vacinas anteriores, esta vacina também não conseguiu fornecer proteção prolongada contra os *Staphylococci* invasivos embora tenha tido maior eficácia e menos efeitos colaterais. Ing-Marie Nilsson e outros (1998) demonstraram que a vacinação com uma versão recombinante da adesina de colágeno, protegeu camundongos contra o desafio heterólogo do *S.aureus*. O Dr. Gerald Píer e outros (1999) demonstraram que a vacinação com a superfície purificada de polissacarídeos PNSG (poli-N-sucinil Beta-1-6 glucosamina) em *S.aureus* protegeu camundongos contra um desafio de *S.aureus*.

Mas no momento, não existe vacina no mercado fornecendo proteção completa contra infecções estafilocócicas (Michie 2002). As estratégias de vacina objetivando os componentes da superfície microbial reconhecendo as moléculas de matriz adesiva (MSCRAMM) são abordagens viáveis para impedir aderência bacteriana, evitar colonização, e minimizar a disseminação hematógena deste modo parando o início e a progressão da infecção. Portanto, na procura de uma candidata à vacina nova, as proteínas de superfície do *S.aureus* e *S.epidermidis* foram analisadas *in-silico*. Como a aderência é a etapa crítica na patogênese, as seqüências de genomas completadas disponíveis na base de dados pública das cepas do *S.aureus* e *S.epidermidis* foram analisadas *in-silico* para adesinas estafilocócicas descaracterizadas/desconhecidas. Aqui relatamos a imunização de camundongos com proteína recombinante de *S.aureus* tendo função na adesão e propriedade

autolítica, dando proteção contra o desafio heterólogo do *S.aureus* e *S.epidermidis*.

Os seguintes pacientes poderiam se beneficiar da vacina contra o *S.aureus* e *S.epidermidis*: pacientes cirúrgicos submetendo-se a procedimentos ortopédicos e cardíacos demorados, pacientes queimados e com traumatismo, pacientes recebendo um dispositivo médico implantado ou de prótese, recém-nascidos cujos sistemas imunológicos ainda não estão desenvolvidos, indivíduos em tratamento prolongado, pacientes de diálise renal.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1. Mostra a variação de aminoácidos conservados da proteína Aaa do *S.aureus* (SEQ ID NO.2) e o gene homólogo Aae dos genes do *S.epidermidis* feita por TEXSHADE (Biology WorkBench) no limite de identidade de 50%.

Figura 2. Análise do domínio do gene Aaa por Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>). Esta proteína tem 3 domínios LysM entre os resíduos 4-47, 68-111 e 135-178 e um domínio CHAP entre os resíduos 191-311.

Figura 3. Representa a análise da proteína purificada na SDS PAGE (15%). A raia 1 mostra o padrão de migração dos marcadores de peso molecular da proteína e a raia 2 mostra a proteína purificada.

Figura 4. Gel de agarose mostrando a presença do gene de adesina autolisina no *S.aureus* e *S.epidermidis* (A). O *S.aureus* isolados clínicos e as cepas ATCC contêm o gene Aaa necessário para a síntese da adesina autolisina. O PCR desempenhado no DNA cromossômico de 4 isolados clínicos e 3 corantes ATCC do *S.aureus*. A raia 1 - 4 isolados clínicos de pacientes hospitalizados isolados de bacteremia, catéter intravascular, paciente de diálise renal, fêmur, respectivamente e foram resistentes a Meticilina; a raia 5, ATCC 25923; raia 6, ATCC 33591; raia 7, ATCC 29737 (B) *S.epidermidis* isolados clínicos e cepas ATCC contêm o gene Aae necessário para a síntese de adesina autolisina. O PCR desempenhado no DNA cromossômico de três isolados clínicos e

duas corantes ATCC do *S.epidermidis*. Raia 1 - 3 isolados clínicos de pacientes hospitalizados isolados de bacteremia, infecção por ferida pós-operatória, endocardite respectivamente; raia 5, ATCC 12228; raia 6, ATCC 35547; raia 7, marcadores de peso molecular; Bases foram designadas para ampliar um fragmento de 930 pares base correspondente a proteína madura.

Figura 5. Zimograma mostrando a atividade bacteriolítica do Aaa. SDS-PAGE de His6-rotulado Aaa purificado de *E. coli* (raia 2 e 3). O gel de separação (10%) continha células de *S.aureus* inativas pelo calor (0,2%) na raia 2 e células de *S.epidermidis* inativas pelo calor (0,2%) na raia 3 como um substrato para autolisina. A atividade bacteriolítica é visível como uma zona clara em ambos *S.aureus* e *S.epidermidis*, após a incubação em tampão fosfato a 37°C. A seta indica uma atividade bacteriolítica associada Aaa. O marcador de peso molecular é mostrado na raia 1.

Figura 6. Mostrando Western blots de adesina autolisina purificada do *S.aureus* com soro armazenado de camundongos infectados com *S.aureus* e soro armazenado de humanos infectados com *S.aureus*. Raia 1, as posições dos marcadores de massa molecular (kD); raia 2, paciente de soro armazenado; raia 3 adulto saudável de soro armazenado; raia 4, controle negativo - soro armazenado de crianças (de 6 a 18 meses) mostrando nenhuma faixa; raia 5, soro armazenado de camundongos infectados com *S.aureus*; raia 6, soro de camundongos saudáveis armazenado mostrando nenhuma faixa. As faixas indicam a produção de anticorpos contra da adesina autolisina do *S.aureus* quando humanos ou camundongos são expostos ao *S.aureus*. A seta indica uma faixa 34kD correspondente a adesina autolisina.

Figura 7. Representa a eficácia protetora da proteína recombinante. A imunização ativa dos camundongos com proteína recombinante fornece proteção contra o desafio com *S.aureus* e *S.epidermidis*. As barras indicam a média logarítmica CFU por par de rins em camundongos imunizados com proteína Aaa

(barras sólidas) ou com uma proteína irrelevante BSA (barras pontilhadas). Espécies e doses de desafio em CFU por camundongo são dadas abaixo de cada grupo; N= 10 camundongos por grupo. As cepas de desafio foram *S.aureus* ATCC 25293 no grupo A; *S.aureus* ATCC 33591 no grupo B; Isolados clínicos de MRSA (osso fêmur) no grupo C; *S.epidermidis* ATCC 1228 no grupo D.

Figura 8. Mostra quantidades de anticorpos IgG obtidos em soro armazenado de camundongos (8) imunizados por meio intraperitoneal com proteína Aaa. Os animais foram imunizados com 2 doses de 100 µg de proteína. Amostras de sangue foram obtidas em intervalos de 2 semanas por 1-9 semanas após a imunização final.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere a uma vacina para infecção por *Staphylococcus*. A invenção fornece vacina para infecção por *Staphylococcus* em mamíferos em geral e em seres humanos e/ou bovinos em particular. A invenção também fornece uma proteína altamente imunogênica e recombinante, mais especificamente antígeno de superfície do *S.aureus*, que pode ser usado como uma molécula antigênica em uma composição de vacina. Adicionalmente, a dita proteína tem atividade estafilolítica. A proteína recombinante da invenção discutida aqui compreende repetições de domínios LysM, que exibem propriedade de ligação peptidoglicano e domínio CHAP (cisteína, peptidases/hidrolases amino dependente de histidina) que exibe propriedade de clivagem de peptidoglicano. Adicionalmente, a invenção fornece um método para o isolamento e purificação da dita proteína recombinante. A composição da proteína em estabilizador adjuvante portador aceitável farmacologicamente e farmacologicamente também é dada. A composição farmacêutica da dita proteína é imunogênica e é eficaz como uma vacina contra infecções por *Staphylococcus* no modelo animal. Um método imunodiagnóstico foi também desenvolvido para o diagnóstico de infecções estafilocócicas. A proteína é uma

candidata em potencial para fins diagnósticos e profiláticos.

RESUMO

A presente invenção se refere à formulação de polipeptídeo recombinante para uso como vacina para a prevenção e controle de infecções mediadas por *Staphylococcus* em mamíferos. A invenção também descreve um processo para clonar e expressão da dita proteína antígenica de *Staphylococci*. A composição farmacêutica da dita proteína é imunogênica e é eficaz como uma vacina contra infecções por *Staphylococcus*. Um método de imunodiagnóstico também foi desenvolvido para o diagnóstico de infecções por *Staphylococcus*. A proteína é um candidato em potencial para fins diagnósticos e profiláticos.

RELATÓRIO DA INVENÇÃO

Consequentemente a presente invenção fornece uma composição antigênica da proteína compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 ou compreendendo qualquer uma das mutações e variações dela, enquanto as mutações e variações incluem pelo menos um dos seguintes: deletar, e/ou substituição(ões) de domínio dos aminoácidos responsáveis pelas interações proteína-proteína, e/ou o alvo da parede celular e a composição será usada como uma vacina para a prevenção e controle de infecções por *Staphylococcus*.

Uma composição de acordo com a reivindicação 1 na qual a sequência de aminoácidos consiste em SEQ ID NO:3

Uma composição de acordo com a reivindicação 1 na qual a sequência de aminoácidos consiste em SEQ ID NO:4

Uma composição de acordo com a reivindicação 1 na qual a sequência de aminoácidos consiste em SEQ ID NO:5

Uma composição de acordo com a reivindicação 1 na qual a sequência de aminoácidos consiste em 3 domínios LysM e um domínio CHAP

Um constructo de DNA recombinante compreendendo: (i) um vetor, e (ii) pelo menos um fragmento de ácido nucléico que codifica sequências de aminoácidos de acordo com a reivindicação 1 ou suas mutações e /ou variantes delas.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere ao desenvolvimento de uma vacina de proteína recombinante do *S. aureus*, útil para induzir imunidade para a prevenção e tratamento de infecções por *Staphylococcus*. A invenção se refere adicionalmente ao isolamento da proteína e purificação da dita proteína para imunização contra as infecções associadas com *S. aureus* e *S. epidermidis*. A invenção revela que proteína é útil também para a produção de anticorpos para fins diagnósticos e terapêuticos. A presente invenção é baseada na descoberta de que a proteína identificada e expressa na cepa de *S.aureus* tem função na adesão e é altamente imunogênica. A invenção fornece adicionalmente um método para usar proteína purificada como candidata adequada à vacina. A proteína que é expressa e purificada sob a presente invenção é identificável como n° Acesso **GI22217975/BEM CAC80837** (Referência SEQ ID NO:2 e SEQ ID NO:3) correspondendo a Acesso de sequência de DNA n° **GI 22217974/EMBAJ250906** Referencia SEQ ID NO:1) de *S.aureus* na base de dados NCBI. O gene acima e as sequências de proteína foram construídos para reduzir ou abolir potenciais interações proteína-proteína com proteínas celulares e extracelulares tais como as sequências descritas em SEQ ID NO: 4 e em SEQ ID NO: 5. A invenção também fornece composições farmacêuticas de proteína que podem ser usadas como vacina. A presente invenção também descreve um método para extrair resposta imune específica de antígeno pela imunização.

A presente invenção é baseada na clonagem e expressão do gene *Aaa* (SEQ ID NO: 1) codificando uma adesina/autolisina. O gene codifica uma proteína de aminoácidos 334, com 3 repetições de domínios *LysM* que exibem propriedade de ligação peptidoglicano, um domínio *CHAP* exibindo propriedade de clivagem peptidoglicano e um peptídeo de sinal Gram-positivo típico sugerindo que a proteína é uma proteína de parede celular. Porque a aderência bacteriana é a primeira etapa crítica no desenvolvimento da maioria das infecções, é um

alvo atraente para o desenvolvimento de vacinas novas. Para determinar se a vacina baseada em adesão poderia prevenir a infecção por *S.aureus*, camundongos foram ativamente imunizados com proteína recombinante e desafiados por meio intravenoso e intraperitoneal com *S.aureus*. E os camundongos imunizados mostraram um número reduzido ou nenhuma unidade de formação de colônia quando os rins foram processados.

Um método ELISA foi desenvolvido para a análise da proteína e poderia ser usado como método diagnóstico para a detecção do antígeno ou os anticorpos para esta proteína em amostras infectadas.

As figuras seguintes e exemplos estão incluídos para fins de ilustração e não têm a intenção de limitar o escopo da invenção.

EXEMPLO 1

Análise in-silico: as seqüências de aminoácidos e nucleotídeos de ambos Aaa (Autolisina/adesina de *S.aureus*-SEQ ID NO: 2) e Aae (Autolisina/adesina de *S.epidermidis*) foram alinhadas e comparadas por CLUSTALW e TEXSHADE na Biology Workbench 3.2 (<http://workbench.sdsc.edu/>) e mostraram que elas são muito similares como é mostrado na figura 1. A seqüência de aminoácidos Aaa foi submetida a versão Pfam 17.0 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>) para análise do domínio. A análise do domínio Pfam mostrou que a proteína Aaa contém 3 repetições de domínios LysM e um domínio CHAP como é mostrado na figura 2. O domínio LysM (motivo lisina) tem aproximadamente 40 resíduos de comprimento e presentes entre os resíduos 4-47, 68-111 e 135-178. Ele é encontrado em uma variedade de enzimas envolvidas na degradação da parede celular bacteriana e tem uma função de ligação de peptidoglicano geral. O domínio CHAP (cisteína, peptidases/hidrolases amido dependentes de histidina) tem aproximadamente 120 resíduos de comprimento e presentes entre os resíduos 191-310. O domínio CHAP está envolvido na função amidase e muitas das proteínas tendo domínio CHAP estão envolvidas no metabolismo da parede celular das bactérias. O

Sinal dos servidores P 3.0
 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), servidor 1.1 Alvo
 P (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) e a versão PSORT
 6.4 (<http://www.psort.org/>) previu que a proteína Aaa tem
 5 peptídeo de sinal de 25 resíduos e está localizada na parede
 celular.

EXEMPLO 2

Cepas Bacterianas, Condições de Crescimento e Vetores: A
 cepa *E.coli* DHS α foi usada para manipulações de DNA e o vetor
 10 *E.coli* pET1b foi usado para clonagem e expressão do gene
 adesina autolisina. As proteínas recombinantes foram
 expressas em *E.coli* BL21 DE3 RIL. Cepas de *Staphylococci*
 usadas em experiências com animais foram *S.aureus* (MSSA) ATCC
 25923, *S.aureus* (MRSA) ATCC 33591, isolado clínico de
 15 *S.aureus* (resistente a Meticilina - MRSA) do fêmur de um
 paciente hospitalizado e *S.epidermidis* ATCC 12228. Estas
 cepas *S.aureus* e *S.epidermidis* ficaram em cultura em ágar
 sangue por 24 horas, então foram cultivadas em caldo de soja
 triptico contendo 5% de soro filtrado até a fase de registro
 20 atrasado, foram colhidas, lavadas, diluídas em PBS em uma
 concentração apropriada e totais viáveis foram determinados
 pelo método de coagulação no prato para inoculação em
 camundongos. As cepas de *E.coli* contendo os vetores pET15b ou
 pET11b foram selecionadas em caldo Luria-Bertani (LB)/ágar
 25 contendo 50 μ g/ml de ampicilina. As cepas de *S.coli* e
S.epidermidis foram cultivadas em ágar Vogel Johnson contendo
 0,1% de telurite de potássio.

EXEMPLO 3

Clonagem e Seqüenciamento do Gene Codificando o antígeno
 30 **de Proteína:** Todas as manipulações de DNA foram realizadas
 usando métodos padrões. O DNA genômico foi isolado do
S.aureus (ATCC 25293) de acordo com Lindberg e outros (1972).
 Oligonucleotídeos foram designados para ampliar o fragmento
 do gene correspondente à proteína madura do gene da adesina
 35 autolisina (Aaa) do *S.aureus* (Acessão n° AJ250906.1
 gi|22217974; contida dentro da SEQ ID NO: 1; a seqüência da

proteína madura é SEQ ID NO: 3). A sequência do iniciador dianteiro usado para ampliação pelo PCR é: 5'CGAGCPCCATATGGCTACAACTCACACAGTAAAC3' e sequência base reversa:

5 5'CGCTCGAGGGATCCTTATTAGTGATGGTGATGGTGATGGTGAATATATCTATAATTATT
TAC3'. A sequência do nucleotídeo correspondente ao marcador de Histidina 6 foi incluída no iniciador reverso. O produto do gene ampliado foi purificado do gel de agarose, digerido com as enzimas de restrição NdeI e BamHI e ligados pela
10 ligase de DNA T4 dentro do vetor pET11b clivado com as mesmas enzimas de restrição. O vetor ligado foi transformado na cepa *E.coli* DH5 α pelo método CaCl₂. O clone foi confirmado pelo seqüenciamento do DNA pelo método de terminação de cadeia dideóxi usando a máquina de seqüenciamento de DNA ABI PRISM
15 310. O programa de gene PC (Inteligenética) foi usado para o manuseio das seqüências. O plasmídeo contendo o gene Aaa foi isolado e transformado em cepa de *E.coli* BL21 (λ DE3)**RIL** para expressão da proteína alvo.

O gene codificando as seqüências de proteína descritas
20 em SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 5 foram designados após deletar os sítios de interação proteína-proteína potenciais do gene Aaa codificando a proteína de SEQ ID NO: 3. Os genes codificando as seqüências de proteína como em SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 5 foram sintetizados na GenScript Corporation,
25 USA. O ORF codificando as proteínas construídas foram clonadas no sítio EcoRI e BamHI do vetor pGS100 sob o controle do promotor induzível de calor e foram transformadas em *E.coli* BL21 (λ DE3)**RIL**.

EXEMPLO 4

30 **Purificação e Expressão de Proteína:** Culturas de um dia para o outro de células de *E.coli* BL21 DE3**RIL** abrigando o plasmídeo recombinante pET11b foram diluídas de 1:50 em um litro de caldo Luria contendo 50 μ g/ml de ampicilina. As células de *E.coli* foram cultivadas a 37°C com agitação para
35 conseguir um A600 de 0,6, depois do que a expressão da proteína alvo pela polimerase T7 foi induzida pela adição de

isopropil-1-tio-b-D-galactopiranosideo (IPTG) a uma concentração final de 1 mM. As células foram colhidas após 4 horas pela centrifugação a 8.000 rpm por 10 minutos. Os péletes bacterianos foram ressuspensos em tampão A (50 mM de Tampão Fosfato, 0,5 M NaCl, pH 8,0, 4 M Uréia, 1% de Triton X 100, 1 mM PMSF). As células foram lisadas por sonicação em 15 microns de amplitude por duração de 60 segundos com um intervalo de 60 segundos no gelo por 30 ciclos e os lisados bacterianos foram centrifugados a 12.000 g por 30 minutos para remover os detritos bacterianos. Como a proteína alvo formou corpos de inclusão, os péletes de lisado de célula foram lavados duas vezes com o mesmo tampão excluindo PMSF e lavados duas vezes com o mesmo tampão excluindo Uréia e Triton X 100 para removê-los.

O pélete contendo proteína alvo foi solubilizado pela suspensão em 10 volumes de 50 mM de Tampão Fosfato, 0,5 M NaCl, 6 M Uréia, pH 8,0, e mantido em um agitador mecânico. Após 4 horas de solubilização, a centrifugação foi efetuada a 12.000 rpm por 30 minutos. O supernatante contendo proteínas solúveis foi filtrado através de uma membrana de 0,4 µm e retido para purificação adicional. As proteínas recombinantes foram purificadas pela imobilização em cromatografia de afinidade de metal Ni-NTA. Uma coluna contendo matriz de Ni-NTA, conectada a um sistema FPLC, foi equilibrada com tampão A contendo 50 mM de Tampão Fosfato, 0,5 NaCl, 6 M Uréia, pH 8,0. Após o equilíbrio, a supernatante foi aplicada a coluna e a coluna foi lavada com 10 volumes de camada de tampão. Subsequentemente, a coluna foi eluída com tampão B contendo 50mM de Tampão Fosfato, 0,5 M NaCl, 6M Uréia, ph 8, 20-200 mM imidazol. As eluções foram monitoradas para proteína pela verificação de absorvência a 280 nm e frações de pico foram analisadas pela eletroforese do gel de sódio dodecil sulfato-poliacrilamida (SDS-PAGE) (figura 3).

EXEMPLO 5

Ocorrência de adesina autolisina no *S.aureus* e *S.epidermidis*: A presença do gene da adesina autolisina em

várias cepas clínicas do *S.aureus* e *S.epidermidis* foi determinada pelo PCR. As cepas clínicas foram isoladas dos pacientes sofrendo de cesses, infecções associadas à dispositivos, infecções de pele, infecções de diálise renal, etc. Descobriu-se que a proteína adesina autolisina (Aaa) estava presente em todas as seis cepas de seqüências de genoma completadas do *S.aureus* e em duas cepas de seqüências de genoma completadas do *S.epidermidis*. A presença do gene da adesina autolisina nos isolados clínicos do *S.aureus* e do *S.epidermidis* foi confirmada pelo PCR como mostrado na figura 4. Isto mostra que a proteína de adesão autolisina (Aaa) é expressa na maioria das cepas de *S.aureus* e de *S.epidermidis*.

EXEMPLO 6

Análise das Atividades Hidrolíticas do Peptidoglicano - análise zimográfica: A atividade estafilolítica da proteína Aaa foi determinada pela execução de um zimograma em um gel SDS-PAGE a 10% conforme o método descrito anteriormente com pequenas modificações. Resumidamente, 12% de gel de SDS-poliacrilamida foram preparados contendo 0,2% (peso/vol) de células de *S.aureus* mortas por aquecimento como substrato. A proteína purificada recombinante foi carregada e a eletroforese foi realizada em uma corrente constante de 20 mA usando um conjunto de eletroforese de gel viscoso vertical (Hoefer miniVE) a 4°C. Após a eletroforese, o gel foi lavado completamente com água fria destilada contendo 0,1% de TritonX 100 e o gel foi encubado durante a noite a 37°C em tampão de 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0). Análise similar foi realizada com *S.epidermidis* como um substrato. Faixas líticas no gel translúcido foram visualizadas como faixas claras contra um fundo azul em uma luz indireta como é mostrado na figura 5.

EXEMPLO 7

Método Imunodiagnóstico para a detecção de Infecções por *Staphylococcus*:

ELISA: Soros de camundongos e humanos foram testados para anticorpos contra da proteína recombinante de adesina

autolisina Aaa pela análise imunossorvente ligada à enzima (ELISA). Cavidades do microtítulo foram revestidas com proteína purificada (1 mg/ml) em 100µl de tampão de revestimento (100 mM de carbonato de sódio, pH 9,2) por cavidade e incubados durante a noite a 4°C. Sítios de ligação de proteínas adicionais foram bloqueados com 2% (peso/vol) de albumina de soro bovino (BSA) em 200 µl/cavidade em tampão-fosfato salino (PBS-10 mM de fosfato de sódio, pH 7,4, contendo 0,13 M NaCl) em temperatura ambiente por uma hora e lavados cinco vezes com PBST (0,1% Tween 20 em PBS). 100 µl de amostras de soro humano e de camundongos diluídos em PBST foram adicionados a cavidades diferentes e incubados por uma hora a 37°C. O anticorpo desligado foi removido pela lavagem das cavidades por cinco vezes com PBST. Para a detecção do anticorpo ligado, 100µl do anticorpo IgG de anticamundongo de cabra conjugado com peroxidase da raiz forte diluídos a 1:8.000 em PBST e 100 µl do anticorpo IgG de anti-humano de cabra conjugado com peroxidase da raiz forte diluídos a 1:8.000 em PBST foram adicionadas em cavidades respectivos e incubadas por uma hora a 37°C. Após a lavagem das cavidades, complexos de Anticorpos-Antígenos foram quantificados pela medição da conversão do substrato de diidrocloreto de o-fenilenediamina (OPD) e H₂O₂ para produto colorido pela enzima conjugada, em OD 492 nm em uma leitora de micro-lâmina (Bio-Rad). Ambos os grupos de camundongos e humanos infectados mostraram resultados positivos no ELISA. Isto indica que anticorpos contra a proteína autolisina/adesina do *S.aureus* seriam produzidos *in-vivo*, e é imunogênico.

EXEMPLO 8

Western Blot: A proteína recombinante foi operada a 12% SDS-PAGE sob condições de redução e então foi submetida a electroblot em membrana de nitrocelulose por 2 horas a 200 mA usando tampão transferência, tampão CAPS, pH 8,3. A membrana foi então tratada com uma solução contendo 5% (peso/vol) de nata de leite seca em PBS por uma hora, seguida de três lavagens com PBS e depois incubação com soro de título alto

cultivado contra da proteína diluída em camundongo 200 vezes em PBS contendo 0,05% Tween 20 (controle positivo), e soro agrupado de camundongos infectados com *S.aureus*, soro agrupado de humanos infectados com *S.aureus* e soro humano e de camundongo de controle por 1 hora a 37°C. As membranas foram depois lavadas três vezes em PBST e subseqüentemente incubadas por 1 hora a 37°C em 2.000 invólucros diluídos em anticorpo IgG de anticamundongo de cabra conjugado com peroxidase da raiz forte de cabra em PBST, do anticorpo IgG de anti-humano de cabra conjugado com peroxidase da raiz forte em PBST respectivamente. Após a lavagem, a membrana foi tratada com Diamino Benzedeno (DAB) de substrato cromogênico e H₂O₂. O soro humano de controle e de camundongo de controle não mostrou nenhuma faixa enquanto controle positivo e humanos e camundongos infectados com *S.aureus* mostraram faixas positivas correspondentes a proteína alvo como mostrado na figura 6. Isto indica que anticorpos são produzidos em camundongos e humanos, contra a proteína quando infectados com *S.aureus*.

EXEMPLO 9

Análise Opsonofagocítica: Para determinar se anticorpos produzidos contra da proteína Aaa são eficazes na mediação da destruição do *S.aureus*, uma análise de opsonização *in vitro* foi feita. A análise foi feita por um protocolo modificado de McKenney D 2000. A proteína purificada Aaa foi injetada em um coelho para conseguir soro hiperimune, uma rica fonte de anticorpos contra a proteína. Neutrófilos polimorfonucleares foram preparados de sangue fresco coletado de coelho adulto saudável. Um total de 25 ml de sangue de coelho foi misturado com um volume igual de tampão dextran-heparina-sulfato (20g de Dextran500/litro, 65,6g de sulfato de heparina/litro, 9 g de cloreto de sódio/litro) e incubado a 37°C por 1 hora. A camada superior contendo leucócitos foi coletada e lises hipotônicas dos eritrócitos remanescentes foram conseguidas por ressuspensão em 1% de NH₄Cl. Etapas subseqüentes de lavagens foram realizadas com RPMI com 15% de soro bovino

fetal. A contagem de neutrófilos polimorfonucleares foi ajustada para 4×10^6 neutrófilos por ml. A fonte de complemento (complemento coabaia) foi adsorvida com *S.aureus* para remover anticorpos que poderiam reagir com a cepa alvo.

5 Após uma noite de cultivo em caldo de soja tríptico, as células de *S.aureus* foram centrifugadas, o pélete ressuspenso em 1 ml de PBS. A análise opsonofagocítica foi realizada com 100 µl da diluição do soro de título alto e 100 µl da fonte de complemento. A mistura da reação foi incubada em uma
10 cremalheira rotora a 37°C por 90 minutos; amostras foram tomadas na hora zero e após 90 minutos. Cada tubo foi sonificado por 5 segundos a 4 W e então diluído em caldo de soja tríptico contendo 0,55 Tween e laminado sobre lâminas de ágar Vogel Johnson. Tubos sem nenhum soro e tubos com soro de
15 coelhos normais foram usados como controles. A análise feita pelo soro teste mostrou um número reduzido de colônias comparadas à análise de controle. Estas mostraram que anticorpos contra a proteína Aaa são eficazes na mediação da destruição do *S.aureus* pelos fagócitos.

20 **EXEMPLO 10**

Estudos sobre o desenvolvimento da uma formulação de vacina e sua eficácia

A proteína purificada recombinante junto com o PBS mencionado acima, o adjuvante é misturado com pelo menos um
25 dos seguintes estabilizadores usados na variação de concentração de 0,05% até 5%, tais como polióis (Manitol, sorbitol, Glicerol), açúcares (lactose, Trealose, sacarose), albumina de soro humano, aminoácidos (glutamato, arginina, histidina).

30 **Imunização e desafio do camundongo:** A proteína adesina autolisina recombinante esterilizada por filtro e purificada (concentração final de 0,2 mg/ml) e BSA da mesma concentração foi suspensa em PBS estéril (Fosfato Tamponado Salino - 10 mM de Tampão fosfato contendo 0,13M de Cloreto de sódio, pH
35 7,4), contendo 0,5 mg/ml de hidróxido de alumínio (um adjuvante). A formulação da vacina compreendendo 500 µl da

emulsão contendo a proteína purificada (1-1000 microgramas) como antígeno foi injetada em camundongos (4 grupos de camundongos contendo 18 em cada grupo A, B, C, D) por meio intraperitoneal (i.p.) no dia 0 e 500 µl de suspensão BSA injetada em 4 grupos de camundongos contendo 15 em cada grupo: Controle A, Controle B, Controle C, Controle D. No 14º dia uma dose de reforço da proteína foi injetada nos grupos A, B, C e D e BSA foram injetados nos grupos de controle. O desafio foi feito com quatro cepas diferentes de *Staphilococci* em dose subletal para quantificar a vegetação bacteriana. Dez camundongos nos grupos A e controle A foram desafiados pela injeção de $3,4 \times 10^8$ células de ATCC MSSA por camundongo via i.v. Dez camundongos nos grupos B e controle B foram desafiados pela injeção de $3,8 \times 10^8$ células de ATCC MRSA por camundongo via i.v. Dez camundongos nos grupos C e controle C foram desafiados pela injeção de $3,2 \times 10^6$ células de MRSA clínico por camundongo via i.v. Dez camundongos nos grupos D e controle D foram desafiados pela injeção de 4×10^8 células de ATCC *S.epidermidis* por camundongo i.v. Cinco camundongos em todos os grupos foram retirados e mantidos em gaiolas separadas na hora do desafio e soro foi coletado destes camundongos após 1, 3, 5, 7 e 9 semanas após a última imunização para analisar anticorpos de IgG específicos contra a adesina autolisina. Estas experiências foram também repetidas com inoculação intraperitoneal do *S.aureus*.

EXEMPLO 11

Investigação Bacteriana: Após 72 horas de desafio, todos os camundongos foram sacrificados, dissecados e os rins foram retirados assepticamente para investigações bacterianas. Os rins foram lavados com álcool etílico e PBS estéril para retirar as bactérias fixadas à superfície e homogeneizadas separadamente em um pilão estéril. Para quantificar as bactérias uma diluição serial de 10 invólucros foi realizada até uma diluição de 10^{-5} em PBS estéril. Diluições de 1 ml de 10^{-3} até 10^{-5} foram laminadas pelo método da placa de escoamento usando ágar Vogel Johnson (VJ ágar) contendo 1% de

Telurite de Potássio e incubadas a 37°C. Unidades de formação de colônias (cfu) foram contadas após 36 horas e 48 horas de incubação. Para identificação da vegetação peritoneal, 2 ml de PBS estéril foi injetado dentro da cavidade peritoneal de cada camundongo, o abdômen de cada camundongo foi massageado por 2 minutos, e uma amostra do fluido de lavagem foi retirado por uma seringa e cultivado em meios de carne cozida. A cultura do sangue também foi feita para a identificação de qualquer infecção sistêmica. Bactérias também foram testadas para as atividades de coagulase e catalase.

Todos os animais usados neste estudo sobreviveram ao desafio *S. aureus* e *S.epidermidis*. O número de bactérias nos rins dos controles de camundongos vacinados e não-vacinados foram os que se seguem: controles positivos demonstrados 1,0 até $8,1 \times 10^6$ cfu por par de rins por camundongo; camundongos desafiados com $3,4 \times 10^8$ células de MSSA ATCC 25923 (Grupo A) demonstraram de 0 até 7×10^2 cfu por par de rins com somente 2 de 10 camundongos mostraram infecção moderada; camundongos desafiados com $3,8 \times 10^8$ células de MRSA ARCC 33591 (Grupo B) demonstraram de 0 até $5,1 \times 10^4$ cfu por par de rins com somente 3 de 10 camundongos mostrando infecção moderada; camundongos desafiados com $3,2 \times 10^6$ células de MRSA clínico (uma cepa resistente a drogas múltiplas isolada do osso fêmur de um paciente hospitalizado) (Grupo C) demonstraram de 0 até 9×10^3 cfu por par de rins com somente 3 de 10 camundongos mostrando infecção moderada e camundongos desafiados com 4×10^8 células de *S.epidermidis* ATCC 12228 (Grupo D) demonstraram de 0 até 1×10^4 cfu por par de rins com somente 2 de 10 camundongos mostrando infecção moderada. O número de bactérias (cfu)/par de rins em cada animal analisado é mostrado na tabela 1. Amostras de soro foram testadas para título de anticorpos após 1, 3, 5, 7 e 9 semanas após a última imunização e demonstraram título muito alto mesmo 9 semanas após a imunização como é mostrado na figura 8.

TABELA 1: MODELO DE INFECÇÃO ANIMAL
Grupos mostrando CFU do par de rins
Camundongos

	N°S.	A	Controle A	B	Controle B	C	Controle C	D	Controle D
5	1	0	2x10 ⁶	0	2x10 ⁵	0	1,5x10 ⁶	0	2,5x10 ⁶
	2	0	1x10 ⁶	2x10 ³	2,7x10 ⁶	0	1,6x10 ⁴	0	2,5x10 ⁶
	3	0	1x10 ⁶	0	2,9x10 ⁶	0	1x10 ⁶	0	2x10 ⁶
	4	0	1x10 ⁶	0	2,8x10 ⁶	9x10 ³	1,4x10 ⁴	0	2,4x10 ⁶
	5	5x10 ²	6,1x10 ⁶	3,3x10 ⁴	2,7x10 ⁶	0	1x10 ⁶	0	2,2x10 ⁵
10								2	
	6	7x10 ⁶	9x10 ⁶	0	2,2x10 ⁶	8x10 ³	1,5x10 ³	x10 ³	2,4x10 ⁶
	7	0	1x10 ⁶	0	2x10 ⁶	4x10 ³	1,4x10 ⁶	0	2,5x10 ⁶
	8	0	1x10 ⁶	5,1x10 ⁴	2,6x10 ⁶	0	1,6x10 ⁶	0	1,9x10 ⁶
	9	0	1x10 ⁶	0	1,9x10 ⁶	0	1,4x10 ⁶	0	1,8x10 ⁶
15								1	
	10	0	8,1x10 ⁶	0	2x10 ⁶	0	1,2x10 ⁶	x10 ⁴	2x10 ⁴

CFU - Unidade de Formação de Colônia; 1-10 indicam a identificação do Camundongo.

O teste de Fisher foi aplicado para determinar a importância das diferenças entre grupos de controle e vacinados. A redução da contagem bacteriana em rins de camundongos imunizados foi significativa. Rins de 80% dos camundongos imunizados no grupo A, 70% nos grupos B e C não mostraram a presença de bactérias após o desafio *S.aureus* e 80% dos camundongos imunizados no grupo D não mostraram a presença de bactérias após o desafio *S.epidermidis* como mostrado na tabela 2. Cada grupo de média geométrica de CFU é significativamente diferente da média de CFU do grupo de controle como é mostrado na tabela 3. Pelos meios, podemos ver que a infecção é muito mais alta entre camundongos no grupo de controle do que a dos grupos vacinados como mostrado na figura 7. A diferença entre os grupos de controles (Controle A-D) e os grupos vacinados (Grupo A-D) foi estatisticamente significativa como mostrado na tabela 4.

TABELA 2: FREQUÊNCIAS E PORCENTAGENS DE CAMUNDONGOS BASEADAS NO ESTADO DA INFECÇÃO

Grupo	Infectado		Não Infectado	
	N	%	N	%
A	2	20,0	8	80,0
Controle A	10	100,0	0	0,0
B	3	30,0	7	70,0
Controle B	10	100,0	0	0,0
C	3	30,0	7	70,0
Controle C	10	100,0	0	0,0
D	2	20,0	8	80,0
Controle D	10	100,0	0	0,0

TABELA 3: MÉDIA GEOMÉTRICA DE CFU

Grupo	Média geométrica de CFU
A	0,55441
Controle A	6,2949
B	1,25271
Controle B	6,37116
C	1,14594
Controle C	6,12779
D	0,7301
Controle D	6,34326

TABELA 4: TESTE DE PROPORÇÕES PARA GRUPO VACINADO E GRUPO DE CONTROLE

Grupos	Proporção de camundongos no Grupo Vacinado	Proporção de camundongos no Grupo de controle	Valor - p
A vs. Ctrl A	0,20	1	0,0007
B vs. Ctrl B	0,30	1	0,003
C vs. Ctrl C	0,30	1	0,003
D vs. Ctrl D	0,20	1	0,0007

EXEMPLO 12**5 Análise e Desenvolvimento Imunoterapêuticos**

Camundongos Balb/c foram hiperimunizados com a proteína Aaa purificada recombinante pela rota intraperitoneal de imunização. Soro hiperimune específico foi usado para purificação da fração IgG pela proteína coluna G. O IgG purificado foi usado para imunização passiva dos camundongos Balb/c (grupo de teste n=8) que foram subsequentemente desafiados com 10^8 cfu da cepa de *S.aureus* ATCC MSSA. O grupo de controle (grupo de controle n=8) foi injetado com igual volume do veículo no lugar da fração IgG.

15 Ambos os grupos foram observados para a mortalidade por

48 horas. O grupo de teste (n=8) sobreviveu o desafio do *S.aureus*. Entretanto foi observada 100% de mortalidade no grupo de controle (n=8) de animais.

EQUIVALENTES

5 A especificação escrita anteriormente é considerada suficiente para capacitar uma pessoa versada na técnica a praticar a invenção. A presente invenção não está limitada em escopo pelos exemplos fornecidos, já que os exemplos são planejados como uma única ilustração de um aspecto da
10 invenção e outras modalidades equivalentes funcionalmente estão compreendidas no escopo da invenção. Várias modificações da invenção em acréscimo a aquelas mostradas e descritas na presente invenção serão aparentes para aqueles versados na técnica pela descrição anterior e se enquadram
15 dentro do escopo das reivindicações anexadas. As vantagens e objetivos da invenção não estão necessariamente incluídos por cada modalidade da invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição, **caracterizada** pelo fato de que compreende proteína de sequência modificada de aminoácidos de SEQ ID NO. 2, ao passo que a(s) modificação(ões) de aminoácidos inclui pelo menos um dos seguintes:

- i) adicionar/deletar aminoácido(s);
- ii) substituição(ões) de domínio dos aminoácidos;
- iii) mutação(ões);

a fim de reduzir interações proteína - proteína e/ou o alvo da parede celular, em que a composição será usada para prevenção e controle de infecções por *Staphylococcus*.

2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende a SEQ ID NO.: 3.

3. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende a SEQ ID NO.: 4.

4. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende a SEQ ID NO.: 5.

5. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a sequência de aminoácidos compreende 3 domínios LysM e um domínio CHAP.

6. Fragmento de nucleotídeo, da SEQ ID NO.: 1 de preferência sequência de nucleotídeo 105 a 1034, **caracterizado** pelo fato de que condifica a proteína antigênica da reivindicação 1.

7. Constructo de DNA recombinante, **caracterizado** pelo fato de que compreende (i) um vetor e (ii) pelo menos um fragmento de ácido nucléico que codifica a sequência de aminoácido de acordo com as reivindicações 1 a 6.

8. Constructo de DNA recombinante, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de que o vetor é vetor de expressão plasmídeo procariótico sendo clonado em hospedeiro procariótico de preferência *E. coli*.

9. Constructo de DNA recombinante, de acordo com a

reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de que o vetor é vetor de expressão plasmídeo procariótico sendo clonado em hospedeiro eucariótico.

10. Método para produzir proteína da reivindicação 1,
5 **caracterizado** pelo fato de que compreende as seguintes etapas:

(a) cultura de célula hospedeira clonada com constructo de DNA recombinante da reivindicação 8;

(b) colheita de células e isolamento da proteína
10 recombinante das mesmas;

(c) purificação da referida proteína.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10,
caracterizado pelo fato de que sob condições de desnaturação em que a solubilização da proteína é conduzida utilizando
15 pelo menos um dos seguintes agentes de desnaturação: uréia, cloridrato de guanidina na faixa de 0,1M a 12M e ainda capturando a referida proteína em adjuvante.

12. Composição de proteína das reivindicações 1 a 5 e 11, **caracterizada** pelo fato de que compreende pelo menos um
20 dos seguintes adjuvantes: hidróxido de alumínio, fosfato de alumínio, fosfato de cálcio, óleo mineral ou qualquer outro composto adequado que pode ser usado como um adjuvante.

13. Composição farmacêutica, **caracterizada** pelo fato de que compreende proteína purificada das reivindicações 1 a 5 e
25 12 em uma quantidade eficaz tal como na faixa de 1 a 1.000 µg e a ser usada como uma vacina em um veículo farmacêutica e fisiologicamente aceitável.

14. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizada** pelo fato de que compreende
30 proteína purificada conjugada por meio de um ligante ou sem um ligante a um veículo farmacêutica e fisiologicamente aceitável, em que o veículo é peptídeo, polisacarídeo ou qualquer outra molécula orgânica, inorgânica.

15. Composição farmacêutica, de acordo com a
35 reivindicação 13, **caracterizada** pelo fato de que compreende pelo menos um dos seguintes tampões veículo: tampão fosfato,

tampão fosfato-citrato ou qualquer outro tampão farmacêutica e fisiologicamente aceitável e ainda compreendendo um adjuvante adicionado como reivindicado na reivindicação 12.

16. Composição farmacêutica, de acordo com a
5 reivindicação 13, **caracterizada** pelo fato de que compreende agente(s) estabilizante(s) farmacêutica e fisiologicamente aceitável(is) pelo menos um dos seguintes na faixa de 0,05% a 5%: polióis, glicerol, albumina de soro humano, açúcares e aminoácidos.

10 17. Formulação, **caracterizada** pelo fato de que compreende um plasmídeo recombinante e um veículo farmacêuticamente aceitável, o plasmídeo consistindo em pelo menos uma sequência de codificação de nucleotídeo de um antígeno de proteína *Staphylococcus aureus* como reivindicada
15 nas reivindicações 1 a 5 incluindo seqüências regulatórias de transcrição e translação ligadas de modo operável à sequência de nucleotídeo para expressar o polipeptídeo em mamíferos.

18. Método para uso da composição das reivindicações 1 a 16, **caracterizado** por ser para preparação de qualquer forma
20 de imunodiagnóstico de infecção(ões) por *Staphylococcus*.

19. Método para uso da composição das reivindicações 1 a 16, **caracterizado** por ser para preparação de qualquer forma de imunoterapêutica para infecção(ões) por *Staphylococcus*.

20. Método de administrar composição farmacêutica das
25 reivindicações 1 a 16, **caracterizado** pelo fato de ser por pelo menos uma das seguintes rotas: intramuscular, intradérmica, subcutânea, intravenosa, oral, intranasal.

21. Método de prevenção e controle de infecções associadas a *Staphylococcus*, em humanos, bovinos e outros
30 mamíferos, **caracterizado** pelo fato de que inclui sem limitação pacientes de diálise renal, pacientes que sofrem cirurgia, pacientes com dispositivos médicos residentes, sujeitos com ferimentos traumáticos, veículos sintomáticos e assintomáticos, pela administração aos sujeitos de uma
35 quantidade eficaz da composição das reivindicações precedentes.

1	QSSMTFADEICTSELSAYAAQWLAFTETTPQGSVLAISRYGDISLN	<i>S. aureus</i>
1	QSSMTFQATICTFALSAIARVIAQAATETTPQGSVLSIENKYGISIAN	<i>S. epidermidis</i>
61	AKSLNALTANLISPECLVLESCSSLSPESSGEPSPWGGGSYTFQAGSS	<i>S. aureus</i>
51	AKSLNQLTSHLIFPQGVLENGSSS.....RAESTUSGIVTFYAGSS	<i>S. epidermidis</i>
101	SLTAPEYATTFQMIHLEGLTFDYPCIKKVSCHLSSNAISHSST	<i>S. aureus</i>
94	SSFAAKYGFYCAIQLGLNLTLPCHSLKVGCHPESSRAKSSG..	<i>S. epidermidis</i>
151	STHEEGGSYTFQAGDELSLISXYGITYGELSLHCHNFFIYPCQNIK	<i>S. aureus</i>
142	..SSCTATTFYCPSSALASKFGITTKINQLNCHPEFIYPCQNIK	<i>S. epidermidis</i>
201	PLG.EASTNECSATLTPRGQVTPDESHCHLYINGCTDSEYENRRAPIGKG	<i>S. aureus</i>
190	TPGGSSESSSENNYASPCGYSPTDTHCHLYTSGSCTDSEYENRRAPIGKG	<i>S. epidermidis</i>
250	LEYYWVHRENNDNAANAGCYTIDHPTVGSIACTDAGTYHNVSVLEQNM	<i>S. aureus</i>
240	LEYYWVHRENNDNAANAGCYTIDHPTVGSIACTDAGTYHNVSVLEQNM	<i>S. epidermidis</i>
300	SGSELVSENNSAAPGILYETDPAVQSLRYLYTH	<i>S. aureus</i>
280	SGSELVSENNSAAPGILYETDPAVQSLRYLYTH	<i>S. epidermidis</i>

 : Não conservado
 : Conservado

FIG. 1



FIG. 2

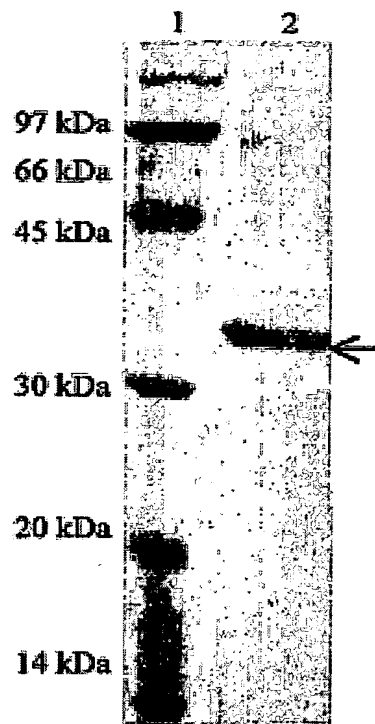


FIG. 3

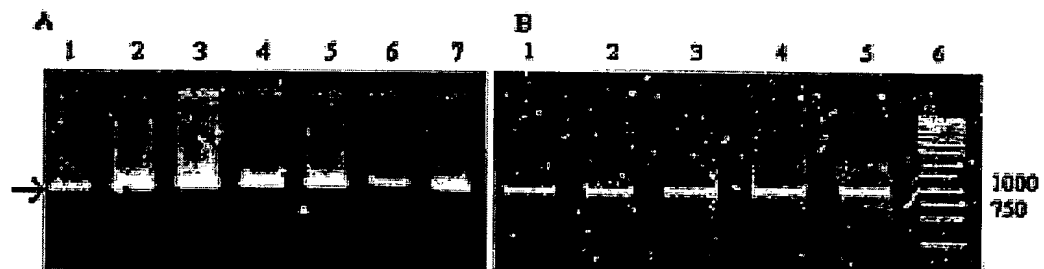


FIG. 4

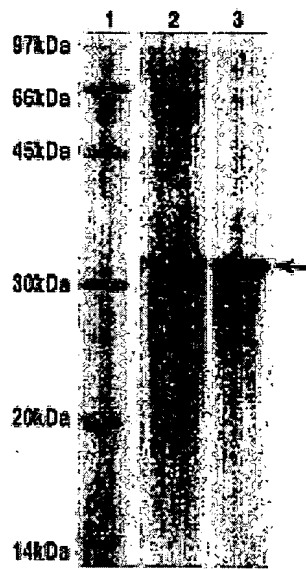


FIG. 5

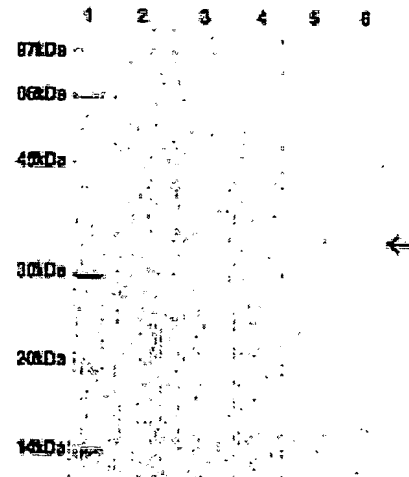


FIG. 6

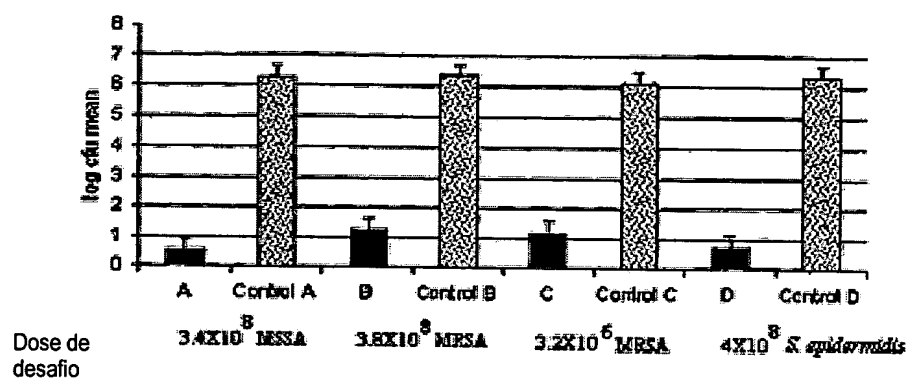


FIG. 7

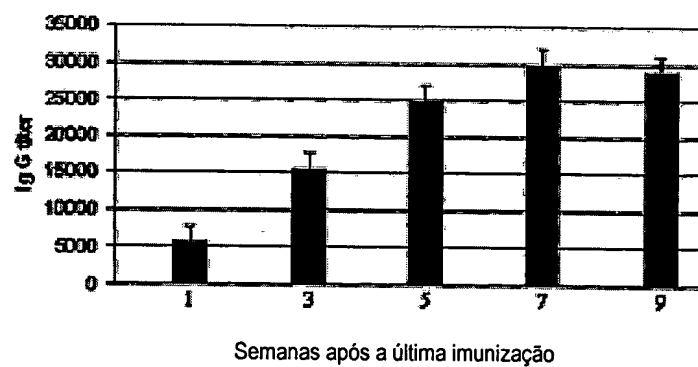


FIG. 8

**COMPOSIÇÃO, FRAGMENTO DE NUCLEOTÍDEO, CONSTRUCTO DE DNA
RECOMBINANTE, MÉTODO PARA PRODUZIR PROTEÍNA, COMPOSIÇÃO
FARMACÊUTICA E MÉTODO PARA USO DA MESMA, FORMULAÇÃO, MÉTODO
DE ADMINISTRAR COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODO DE PREVENÇÃO E
CONTROLE DE INFECÇÕES ASSOCIADAS A STAPHYLOCOCCUS**

A presente invenção descreve método de preparação e uso de formulação de vacina de polipeptídeo para prevenção e controle de infecções mediadas por *Staphylococcus* em humanos, bovinos e outros mamíferos, usando tecnologia de DNA recombinante.