



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

(21) **PI0708079-4 A2**

(22) Data de Depósito: 16/02/2007
(43) Data da Publicação: 17/05/2011
(RPI 2106)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 14/315

(54) Título: **PURIFICAÇÃO DE ANTÍGENOS BACTERIANOS**

(30) Prioridade Unionista: 17/02/2006 US 60/774.450

(73) Titular(es): NOVARTIS AG

(72) Inventor(es): Antonello Covacci, Lliaia Ferlenghi, Markus Hileringmann

(74) Procurador(es): ORLANDO DE SOUZA

(86) Pedido Internacional: PCT IB2007001948 de 16/02/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/116322 de 18/01/2007

(57) Resumo: PURIFICAÇÃO DE ANTÍGENOS BACTERIANOS. São apresentados métodos de isolamento de fímbrias e de estruturas semelhantes a fímbria a partir de bactérias gram-positivas, incluindo *Streptococcus pneumoniae*, e composições que incluem essas fímbrias isoladas. Essas composições são úteis como composições imunogênicas para a produção de anticorpos e imunoestimulação. Também são apresentados métodos de inibição de *Streptococcus pneumoniae* e métodos de identificação de inibidores de *Streptococcus pneumoniae*.

PURIFICAÇÃO DE ANTÍGENOS BACTERIANOS**Referência Cruzada Com Pedidos Relacionados**

Este pedido reivindica o benefício do Pedido U.S. Provisório N° de Série 60/774.450, depositado em 17 de
5 fevereiro de 2006, cujo conteúdo é aqui incorporado por referência em sua totalidade.

Campo Da Invenção

A presente invenção está relacionada às fímbrias obtidas de bactérias gram-positivas, incluindo
10 *Streptococcus pneumoniae*, métodos de produção e isolamento das fímbrias, e ao uso das fímbrias para a indução de uma resposta imunológica contra bactérias gram-positivas. A presente invenção também fornece, *inter alia*, métodos de detecção de infecção bacteriana gram-positiva, métodos de
15 tratamento de infecção bacteriana gram-positiva, e métodos de identificação de inibidores de fímbrias bacterianas gram-positivas que se ligam a um substrato. Também são fornecidos anticorpos que se ligam às fímbrias.

Fundamentos Da Invenção

20 A bactéria gram-positiva *Streptococcus pneumoniae* (também conhecida como pneumococo) é uma causa importante de morbidade e mortalidade em todo o mundo, e representa um dos quatro principais responsáveis por mortes em doenças infecciosas, junto com HIV, malária e tuberculose (1-5). É
25 uma causa importante de infecções do trato respiratório como, por exemplo, otite média, sinusite e pneumonia adquirida na comunidade, mas também é um patógeno importante em doenças invasivas como, por exemplo, septicemia e meningite. Embora o pneumococo seja um
30 patógeno devastador, ele também coloniza de forma

inofensiva em um grau elevado crianças saudáveis que freqüentam creches (6, 7). Um fator de virulência importante na doença pneumocócica é a cápsula polissacarídica, pela qual os pneumococos são agrupados em pelo menos noventa sorotipos diferentes (8). Outros fatores genéticos, por exemplo, CbpA (proteína A de ligação de colina) e pneumolisina, foram descritos como sendo importantes para a virulência (9-11).

A infecção por *S. pneumoniae* leva a uma doença invasiva desencadeada pela colonização inicial da nasofaringe, mas os mecanismos de adesão não são bem compreendidos. A adesão *in vitro* de pneumococos encapsulados é bem menor do que dos derivados não encapsulados não virulentos (4), embora a expressão da cápsula seja essencial para a colonização bem sucedida das vias aéreas superiores. Essas observações sugerem que, *in vivo*, os pneumococos são adesivos, apesar da produção de uma cápsula espessa (5).

Em outras bactérias gram-positivas, por exemplo, *Corynebacterium diphtheriae* (12, 13), *Actinomyces* spp. (14) e, recentemente, estreptococos do grupo A (GAS) e estreptococos do grupo B (GBS) (15, 16), estruturas de superfície semelhantes a fímbrias por microscopia eletrônica foram identificadas e caracterizadas geneticamente, bem como bioquimicamente (12, 13, 15, 16). Em *Actinomyces* spp., genes de fímbrias do tipo 1 medeiam a adesão às superfícies dentárias e mucosas (17). No entanto, há necessidade de dados funcionais sobre o papel e a função fisiológicos na doença infecciosa de fímbrias em *Streptococcus* spp. patogênico.

Fímbrias gram-positivas são polímeros prolongados formados por uma reação de transpeptidase que envolve proteínas de subunidades de entrecruzamento covalente que contêm padrões de aminoácidos específicos, que são montados por sortases específicas. Sortases também são responsáveis por adesão covalente das fímbrias à parede celular de peptidoglicano.

Sumário Da Invenção

A presente especificação descreve, *inter alia*, o isolamento e a caracterização de fímbrias da bactéria gram-positiva *Streptococcus pneumoniae*. As fímbrias têm participação na patogênese de *S. pneumoniae* e de outras bactérias gram-positivas, e são úteis, *inter alia*, em métodos de tratamento e imunização contra infecções bacterianas gram-positivas.

Em alguns aspectos, a especificação fornece fímbrias bacterianas gram-positivas isoladas, por exemplo, fímbrias de *Streptococcus pneumoniae*, fímbrias de estreptococos do grupo A (GAS) ou fímbrias de estreptococos do grupo B (GBS). Em algumas modalidades, as fímbrias compreendem pelo menos uma de uma proteína RrgA de *S. pneumoniae*, uma proteína RrgB de *S. pneumoniae* e uma proteína RrgC de *S. pneumoniae*, por exemplo, um polipeptídeo que possui a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 2, ID. DE SEQ. N°: 4 ou ID. DE SEQ. N°: 6, ou uma forma processada desta. Em algumas modalidades, as fímbrias isoladas possuem um peso molecular de cerca de 1×10^5 a 1×10^7 Da ou, em algumas modalidades, de 2×10^6 a 3×10^6 Da. Em algumas modalidades, as fímbrias isoladas possuem um comprimento de filamento de cerca de 0,1 a 2 μm (por exemplo, cerca de

0,1, 0,2, 0,5, 1, 1,5 ou 2 μm). Em algumas modalidades, as fímbrias isoladas possuem um diâmetro de cerca de 10 nm (por exemplo, cerca de 8, 9, 10, 11 ou 12 nm). Em algumas modalidades, as fímbrias isoladas compreendem três
5 protofilamentos.

Em algumas modalidades, as fímbrias são separadas das células por digestão enzimática (por exemplo, com uma ou mais enzimas líticas como, por exemplo, peptidoglicano hidrolases (por exemplo, mutanolisina, lisostafina e
10 lisozima)). Em algumas modalidades, as fímbrias são separadas das células por cisalhamento mecânico (por exemplo, por ultrassonificação). Em algumas modalidades, as fímbrias são separadas das células por diminuição ou inibição da atividade de SrtA. Em algumas modalidades, as
15 fímbrias são separadas das células por tratamento das células com um composto que interfere com a integridade da parede celular (por exemplo; um antibiótico). Em algumas modalidades, as fímbrias são substancialmente livres de células bacterianas. Em algumas modalidades, as fímbrias
20 são substancialmente livres de peptidoglicanos. Em algumas modalidades, a especificação apresenta métodos de produção das fímbrias bacterianas gram-positivas isoladas (por exemplo, fímbrias de *S. pneumoniae*), em que os métodos incluem a exposição de uma célula bacteriana que produz
25 fímbrias bacterianas gram-positivas (por exemplo, fímbrias de *S. pneumoniae*) à digestão enzimática ou ao cisalhamento mecânico, e o isolamento das fímbrias da célula.

Em alguns aspectos, a especificação apresenta composições imunogênicas que compreendem uma ou mais das
30 fímbrias bacterianas gram-positivas isoladas (por exemplo,

fímbrias de *S. pneumoniae*).

Em alguns aspectos, a especificação apresenta métodos de isolamento de fímbrias bacterianas gram-positivas (por exemplo, fímbrias de *S. pneumoniae*, GAS ou GBS), em que os

5 métodos compreendem a separação de fímbrias de células bacterianas que produzem fímbrias bacterianas gram-positivas (por exemplo, células bacterianas gram-positivas ou células bacterianas transformadas para a produção de fímbrias gram-positivas), e o isolamento das fímbrias das

10 células. Em algumas modalidades, as fímbrias são separadas das células por digestão enzimática (por exemplo, com uma ou mais enzimas líticas como, por exemplo, peptidoglicano hidrolases (por exemplo, mutanolisina, lisostafina e lisozima)). Em algumas modalidades, as fímbrias são

15 separadas das células por cisalhamento mecânico (por exemplo, por ultrassonificação). Em algumas modalidades, as fímbrias são separadas das células por diminuição ou inibição da atividade de SrtA. Em algumas modalidades, as fímbrias são separadas das células por tratamento das

20 células com um composto que interfere com integridade da parede celular (por exemplo, um antibiótico). Em algumas modalidades, o isolamento compreende uso de uma centrifugação por gradiente de densidade. Em algumas modalidades, o isolamento compreende a redução da

25 polidispersibilidade, por exemplo, a separação dos componentes por tamanho, por exemplo, com o uso de cromatografia por filtração em gel. Em algumas modalidades, o isolamento inclui uma ou mais etapas de cromatografia, por exemplo, cromatografia por filtração em gel,

30 cromatografia por troca iônica, cromatografia de fase

reversa ou cromatografia por afinidade. Em algumas modalidades, o método ainda compreende uma ou mais etapas de concentração.

Em alguns aspectos, a especificação apresenta anticorpos que se ligam especificamente a uma fímbria bacteriana gram-positiva isolada (por exemplo, uma fímbria de *S. pneumoniae*). Em algumas modalidades, os anticorpos são anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, anticorpos quiméricos, anticorpos humanos, anticorpos humanizados, anticorpos de cadeia simples ou fragmentos Fab. Em algumas modalidades, os anticorpos são marcados, por exemplo, com uma enzima, um radioisótopo, uma toxina, um agente de contraste (por exemplo, uma partícula de ouro) ou um fluoróforo. Em algumas modalidades, os anticorpos se ligam preferencialmente a uma fímbria de *S. pneumoniae* ou a um fragmento desta, comparada com a ligação dos anticorpos às proteínas individuais que constituem a fímbria. Em algumas modalidades, os anticorpos se ligam preferencialmente a um complexo de fímbrias, comparada com a ligação do anticorpo a uma proteína da fímbria que não está em complexo selecionada do grupo que consiste em RrgA, RrgB e RrgC. Em algumas modalidades, os anticorpos não se ligam especificamente à RrgA, RrgB ou RrgC que não estão em complexo.

Em alguns aspectos, a especificação apresenta métodos de indução de uma resposta imunológica contra uma bactéria gram-positiva (por exemplo, *S. pneumoniae*), em que os métodos incluem a administração de uma quantidade eficaz de fímbrias bacterianas gram-positivas, por exemplo, fímbrias de *S. pneumoniae* (por exemplo, fímbrias isoladas de *S.*

pneumoniae), a um indivíduo, por exemplo, um ser humano ou um animal não humano.

Em alguns aspectos, a especificação apresenta métodos de detecção de uma infecção bacteriana gram-positiva (por exemplo, uma infecção por *S. pneumoniae*) em um indivíduo, por exemplo, um ser humano, em que os métodos incluem o teste de uma amostra do indivíduo, por exemplo, soro ou escarro, para evidenciar a presença de fímbrias bacterianas gram-positivas (por exemplo, fímbrias de *S. pneumoniae*). Em algumas modalidades, a evidência da presença de fímbrias bacterianas gram-positivas (por exemplo, fímbrias de *S. pneumoniae*) é fornecida pela presença de um anticorpo para fímbrias bacterianas gram-positivas (por exemplo, fímbrias de *S. pneumoniae*). Em algumas modalidades, o anticorpo se liga preferencialmente a um complexo de fímbrias, comparada com a ligação do anticorpo a uma proteína da fímbria que não está em complexo (por exemplo, RrgA, RrgB e RrgC). Em algumas modalidades, o anticorpo não se liga especificamente a uma proteína da fímbria que não está em complexo (por exemplo, RrgA, RrgB ou RrgC).

Em alguns aspectos, a especificação apresenta métodos de detecção de uma infecção bacteriana gram-positiva, por exemplo, de uma infecção por *S. pneumoniae*, em um indivíduo, em que os métodos incluem o contato de uma amostra com um agente (por exemplo, um anticorpo) que se liga especificamente a uma fímbria bacteriana gram-positiva, por exemplo, uma fímbria de *S. pneumoniae*, e a detecção da ligação do agente a um componente da amostra. Em algumas modalidades, o anticorpo se liga preferencialmente a um complexo de fímbrias, comparada com

a ligação do anticorpo a uma proteína da fímbria que não está em complexo (por exemplo, RrgA, RrgB e RrgC). Em algumas modalidades, o anticorpo não se liga especificamente a uma proteína da fímbria que não está em
5 complexo (por exemplo, RrgA, RrgB ou RrgC).

Em alguns aspectos, a especificação apresenta métodos de tratamento de um indivíduo (por exemplo, um indivíduo humano) que possui ou com suspeita de ter uma infecção por bactérias gram-positivas (por exemplo, *S. pneumoniae*), em
10 que os métodos incluem a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um agente que se liga especificamente a fímbrias gram-positivas. Em algumas modalidades, o agente é um anticorpo (por exemplo, um anticorpo monoclonal, um anticorpo policlonal, um anticorpo quimérico, um anticorpo
15 humano, um anticorpo humanizado, um anticorpo de cadeia simples ou um fragmento Fab). Em algumas modalidades, o agente (por exemplo, um anticorpo) bloqueia a adesão ou a ligação de bactérias gram-positivas às células como, por exemplo, células hospedeiras. As células podem ser células
20 epiteliais, por exemplo, células dos epitélios do pulmão ou da nasofaringe. Em algumas modalidades, o anticorpo se liga preferencialmente a uma fímbria de *S. pneumoniae* ou a um fragmento desta, comparado com as proteínas individuais que constituem a fímbria. Em algumas modalidades, o agente (por
25 exemplo, um anticorpo) se liga especificamente a uma ou mais proteínas de fímbrias de *S. pneumoniae*, por exemplo, RrgA, RrgB ou RrgC (por exemplo, um ou mais polipeptídeos que possuem a seqüência de aminoácidos dos IDS. DE SEQ. N^{os}: 2, 4 ou 6, ou formas processadas de qualquer um
30 destes). Em algumas modalidades, o agente (por exemplo, um

anticorpo) se liga especificamente a um polipeptídeo que possui os resíduos de aminoácidos 316-419 do ID. DE SEQ. N°: 4. Em algumas modalidades, o agente (por exemplo, um anticorpo) bloqueia pelo menos 50% da adesão de *S. pneumoniae* às células epiteliais pulmonares A549, comparado com um controle, medida em um ensaio de adesão.

Em alguns aspectos, a especificação apresenta métodos para a determinação de um esquema de tratamento para um indivíduo (por exemplo, um indivíduo humano) que possui ou com suspeita de ter uma infecção bacteriana gram-positiva (por exemplo, por *S. pneumoniae*), em que os métodos incluem o teste de uma amostra do indivíduo quanto à presença de um anticorpo para fímbrias gram-positivas, e a escolha de um esquema de tratamento com base na presença ou ausência do anticorpo. O método pode ainda incluir o tratamento do indivíduo com um agente antibiótico, caso a presença do anticorpo não seja detectada. O método também pode incluir o tratamento do indivíduo com um agente antiinflamatório, caso a presença do anticorpo seja detectada.

A especificação também apresenta fímbrias gram-positivas isoladas que incluem polipeptídeos que incluem uma sequência de aminoácidos de uma proteína de uma fímbria gram-positiva (por exemplo, de *S. pneumoniae*) com até 50 (por exemplo, até 40, 30, 20, 10 ou 5) substituições, inserções ou deleções de aminoácidos. Em algumas modalidades, as substituições de aminoácidos são substituições conservativas de aminoácidos. Em algumas modalidades, a proteína da fímbria gram-positiva é RrgA (por exemplo, ID. DE SEQ. N°: 2), RrgB (por exemplo, ID. DE SEQ. N°: 4) ou RrgC (por exemplo, ID. DE SEQ. N°: 6). Em

algumas modalidades, os polipeptídeos incluem as seqüências de aminoácidos de dois ou mais dos IDS. DE SEQ. N^{os}: 2, 4 ou 6, ou fragmentos imunogênicos de qualquer um destes. Em algumas modalidades, os polipeptídeos incluem as seqüências de aminoácidos dos IDS. DE SEQ. N^{os}: 2, 4, e 6, ou fragmentos imunogênicos de todos esses. A especificação também apresenta fragmentos imunogênicos de fímbrias gram-positivas isoladas, por exemplo, aqueles que contêm proteínas da fímbria de *S. pneumoniae* como, por exemplo, RrgA, RrgB e RrgC (por exemplo, fragmentos imunogênicos dos IDS. DE SEQ. N^{os}: 2, 4 e 6). Também são apresentados na especificação métodos de indução de uma resposta imunológica contra uma bactéria gram-positiva (por exemplo, *S. pneumoniae*), em que os métodos incluem a administração de uma quantidade eficaz de uma fímbria gram-positiva isolada a um indivíduo, por exemplo, um indivíduo humano. A especificação também apresenta métodos de produção de fímbrias gram-positivas isoladas por transformação de uma célula hospedeira com um ou mais ácidos nucleicos suficientes para produzir as fímbrias, e o isolamento das fímbrias da célula hospedeira.

Em alguns aspectos, a especificação apresenta métodos de expressão de um anticorpo antifímbria gram-positiva (por exemplo, de *S. pneumoniae*) em uma célula, em que os métodos incluem a expressão de um ácido nucleico que codifica o anticorpo antifímbria gram-positiva na célula.

Em alguns aspectos, a especificação apresenta métodos de purificação de bactérias gram-positivas (por exemplo, *S. pneumoniae*) de uma amostra que inclui as bactérias gram-positivas, em que os métodos incluem o fornecimento de uma

matriz de afinidade que inclui um anticorpo que se liga especificamente a uma fímbria gram-positiva ligada a um suporte sólido; o contato da amostra com a matriz de afinidade para formar um complexo matriz de
5 afinidade/bactéria gram-positiva; a separação do complexo matriz de afinidade/bactéria gram-positiva do restante da amostra; e liberação da bactéria gram-positiva da matriz de afinidade.

Em alguns aspectos, a especificação apresenta métodos
10 de liberação de um agente citotóxico ou um agente diagnóstico a uma bactéria gram-positiva (por exemplo, *S. pneumoniae*), em que os métodos incluem o fornecimento do agente citotóxico ou do agente diagnóstico conjugado a um anticorpo ou fragmento deste que se liga especificamente a
15 uma fímbria gram-positiva (por exemplo, de *S. pneumoniae*); e a exposição da bactéria ao conjugado de anticorpo-agente ou fragmento-agente.

Em alguns aspectos, a especificação apresenta métodos de identificação de moduladores de *S. pneumoniae*, em que os
20 métodos incluem o contato de uma célula suscetível à infecção por *S. pneumoniae*, por exemplo, uma célula HEP2, uma célula CHO, uma célula HeLa ou uma célula dos epitélios pulmonares A549, com um composto candidato e *S. pneumoniae*, e a determinação de se uma atividade de *S. pneumoniae*, por
25 exemplo, adesão a uma célula (por exemplo, uma célula epitelial pulmonar A549), é inibida, em que a inibição da atividade de *S. pneumoniae* é indicativa de um inibidor de *S. pneumoniae*.

Em alguns aspectos, a especificação apresenta métodos
30 de identificação de moduladores da ligação de fímbrias

gram-positivas (por exemplo, de *S. pneumoniae*), em que os métodos incluem o contato de uma célula animal suscetível à ligação de fímbrias gram-positivas com um composto candidato e uma célula bacteriana que possui fímbrias gram-positivas, e a determinação de se a ligação da célula bacteriana à célula animal é inibida, em que a inibição da atividade de ligação é indicativa de um inibidor de ligação de fímbrias gram-positivas.

Em alguns aspectos, a especificação apresenta métodos de identificação de moduladores da ligação de fímbrias gram-positivas (por exemplo, de *S. pneumoniae*), em que os métodos incluem o contato de uma célula suscetível à ligação de fímbrias gram-positivas com um composto candidato e fímbrias gram-positivas, e a determinação de se a ligação das fímbrias à célula é inibida, em que a inibição da atividade de ligação é indicativa de um inibidor de ligação de fímbrias gram-positivas.

Em alguns aspectos, a especificação apresenta métodos de identificação de moduladores da ligação de fímbrias gram-positivas (por exemplo, de *S. pneumoniae*), o referido método compreendendo o contato de uma célula suscetível à ligação de fímbrias gram-positivas com um composto candidato e uma proteína da fímbria gram-positiva ou fragmento de ligação celular desta, e a determinação de se a ligação da proteína da fímbria ou de fragmento desta à célula é inibida, em que a inibição da atividade de ligação é indicativa de um inibidor de ligação de fímbrias gram-positivas.

Em alguns aspectos, a especificação apresenta métodos de identificação de moduladores da ligação de fímbrias

gram-positivas (por exemplo, de *S. pneumoniae*), o referido método compreendendo o contato de uma proteína suscetível à ligação da fímbria gram-positiva, por exemplo, uma proteína da matriz extracelular, ou fragmento de ligação à fímbria gram-positiva desta, com um composto candidato e uma fímbria gram-positiva, proteína da fímbria gram-positiva, ou um fragmento desta, e a determinação de se a ligação entre as duas proteínas ou fragmentos destas é inibida, em que a inibição da atividade de ligação é indicativa de um inibidor de ligação de fímbrias gram-positivas.

A especificação também apresenta composições farmacêuticas, imunogênicas e de vacina que incluem fímbrias bacterianas gram-positivas isoladas (por exemplo, fímbrias de *S. pneumoniae*). A especificação também apresenta o uso de fímbrias gram-positivas (por exemplo, de *S. pneumoniae*) (ou qualquer um dos polipeptídeos ou ácidos nucléicos descritos acima) para a preparação de uma composição imunogênica ou uma composição de vacina para o tratamento ou a profilaxia de infecção bacteriana gram-positiva. A especificação também apresenta fímbrias gram-positivas (por exemplo, de *S. pneumoniae*) (ou qualquer um dos polipeptídeos ou ácidos nucléicos descritos acima) para uso em medicina. A especificação também apresenta fímbrias gram-positivas (por exemplo, de *S. pneumoniae*) (ou qualquer um dos polipeptídeos ou ácidos nucléicos descritos acima) para uso no tratamento ou na prevenção de infecção bacteriana gram-positiva.

A especificação também apresenta composições farmacêuticas que incluem agentes (por exemplo, anticorpos) que se ligam especificamente às fímbrias de *S. pneumoniae*.

A especificação também apresenta o uso de agentes (por exemplo, anticorpos) que se ligam especificamente às fímbrias de *S. pneumoniae* para a preparação de um medicamento para o tratamento ou a profilaxia de infecção por *S. pneumoniae*. A especificação também apresenta tais agentes para uso em medicina. A especificação também apresenta tais agentes para uso no tratamento ou na prevenção de infecção bacteriana gram-positiva.

A especificação também apresenta métodos de isolamento de fímbrias de *Streptococcus pneumoniae*, em que os métodos incluem a separação de fímbrias de células de *S. pneumoniae* que produzem fímbrias de *S. pneumoniae*, por exemplo, TIGR4 de *S. pneumoniae*, e o isolamento de fímbrias de *S. pneumoniae*. Em algumas modalidades, as fímbrias são separadas de células de *S. pneumoniae* por digestão enzimática (por exemplo, com uma ou mais enzimas líticas como, por exemplo, peptidoglicano hidrolases (por exemplo, mutanolisina, lisostafina e lisozima)). Em algumas modalidades, as fímbrias são separadas de células de *S. pneumoniae* por cisalhamento mecânico (por exemplo, por ultrassonificação). Em algumas modalidades, as fímbrias são separadas de células de *S. pneumoniae* por diminuição ou inibição da atividade de SrtA. Em algumas modalidades, as fímbrias são separadas de células de *S. pneumoniae* por tratamento das células com um composto que interfere com integridade da parede celular (por exemplo, um antibiótico). Em algumas modalidades, os métodos incluem a degradação de ácidos nucleicos com uma nuclease. Em algumas modalidades, os métodos incluem a redução da polidispersibilidade, por exemplo, por separação de

fímbrias de *S. pneumoniae* por tamanho com o uso de cromatografia por filtração em gel. Em algumas modalidades, os métodos incluem uma ou mais etapas de cromatografia, por exemplo, cromatografia por filtração em gel, cromatografia
5 por troca iônica, cromatografia de fase reversa ou cromatografia por afinidade. Em algumas modalidades, as células de *S. pneumoniae* que produzem fímbrias de *S. pneumoniae* expressam mais fímbrias do que TIGR4 de *S. pneumoniae*.

10 A menos que definido de forma diferente, todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados possuem os mesmos significados comumente entendidos por aqueles habilitados na técnica à qual esta invenção pertence. Embora métodos e materiais similares ou equivalentes
15 àqueles aqui descritos possam ser usados na prática ou teste da presente invenção, métodos e materiais adequados serão descritos abaixo. Todas as publicações, pedidos de patentes, patentes e outras referências aqui mencionadas são incorporadas por referência em sua totalidade. Em caso
20 de conflito, o presente pedido, incluindo definições, será determinante. Além disso, os materiais, métodos e exemplos são somente ilustrativos e não têm a intenção de limitar a invenção.

Os detalhes de uma ou mais modalidades da invenção são
25 apresentados nos desenhos que acompanham a invenção e na descrição abaixo. Outras características, objetivos e vantagens da invenção ficarão evidentes a partir da descrição e dos desenhos, e a partir de modalidades adicionais abaixo.

30 Breve Descrição Dos Desenhos

Fig. 1. (A) Coloração negativa de *S. pneumoniae* cepa T4 que mostra fímbrias abundantes na superfície bacteriana. (B) Coloração negativa de cepa mutante *T4Δ (rrgA-srtD)* que mostra ausência de fímbrias. (C) Coloração negativa do mutante *T4Δ (mgrA)* que mostra fímbrias abundantes. (D) Coloração negativa do mutante *T4Δ (rrgA-srtD, nzgrA)* que mostra ausência de fímbrias na superfície bacteriana. (E) Marcação por imuno-ouro de T4 pela utilização de anti-RrgA. (F) Marcação por imuno-ouro de T4 com anti-RrgB (5 nm) e anti-RrgC (10 nm). Demonstrou-se que anti-RrgB decora todas as fímbrias (barra, 200 nm). (G) Grande aumento de fímbrias T4 com marcação dupla com anti-RrgB (5 nm) e anti-RrgC (10 nm). Ela mostra marcação específica de uma fímbria por anti-RrgC, como indicado pelas setas (barra, 100 nm). (H) Marcação por imuno-ouro do mutante por eliminação de *S. pneumoniae T4Δ (rrgA-srtD)* sem fímbrias visíveis na superfície detectáveis por anti-RrgB e anti-RrgC (barra, 200 nm).

Fig. 2. Organização do genoma da ilha *rlrA* na cepa T4 sorotipo 4 (TIGR4), e comparação com a cepa de laboratório R6 de seqüências disponíveis. A cepa 19F, ST162^{19F}, compartilha uma organização similar com uma identidade de seqüência global de 98%, enquanto a cepa não encapsulada R6 e sua progenitora D39 são cepas ilha de fímbrias-negativas. Seqüências de inserção (*IS1167*) flanqueiam o locus em cepas positivas [uma das transposases é *frame-shifted* (fs)], enquanto um elemento RUP (unidade de repetição em pneumococo) é identificado na cepa ilha de fímbrias-negativa. O tamanho do locus, além de seu teor relativo de G+C, é mostrado. A posição do regulador

negativo *mgrA* é indicada. É incluída para comparação a organização do genoma das ilhotas que codificam estruturas de fímbrias em *Streptococcus agalactiae* e *Corynebacterium diphtheriae*.

5 Fig. 3. (A) Western blot com o uso de um gel de gradiente de poliacrilamida 4-12% com o anti-soro de RrgB detecta uma escala de polímeros de alto peso molecular (HMW) em cepas que expressam fímbrias (T4, T4Δ (*mgrA*), ST162^{19F} e ST16219FΔ (*mgrA*)), enquanto as cepas mutantes
10 desprovidas de fímbrias (T4Δ (*rrgA-srtD*), T4Δ (*rrgA-srtD*, *mgrA*) e ST162^{19F}Δ (*rrgA-srtD*)) não possuem polímeros HMW. O mutante *mgrA* mostra uma intensidade aumentada, quando comparado com o respectivo tipo selvagem. (B) Western blot com o anti-soro de RrgB com o uso de um gel de gradiente 4-
15 12% para D39 desprovida da ilhota, o mutante D39 com a ilhota *rlrA* introduzida (D39V (*rrgA-srtD*)) e seu derivado por eliminação *rlrA* (D39V(*rrgA-srtD*) Δ (*rlrA*)).

Fig. 4. (A) Aderência de D39 e D39V (*rrgA-srtD*), além de D39V(*rrgA-srtD*)A(*rlrA*), às monocamadas de células
20 epiteliais pulmonares A549. (B-D) Microscopia por imunofluorescência de D39 (B), D39V (*rrgA-srtD*) (C) e D39V(*rrgA-srtD*)A(*rlrA*) (D) que aderem às células epiteliais pulmonares A549. É mostrada a marcação de pneumococos com anticorpo anticapsular (verde) e a
25 visualização de F-actina epitelial com rodamina (vermelho).

Fig. 5. (A-E) Ataque intranasal de camundongos C57BL/6 com T4 com fímbrias e seu mutante isogênico por eliminação sem fímbrias T4Δ (*rrgA-srtD*). (A e B) Sobrevida de camundongos após inoculação com 5×10^6 cfu (dose alta, A)
30 ou 5×10^5 cfu (dose média, B). A sobrevida foi analisada

pela utilização do teste *log-rank* de Kaplan-Meier. (C, E) Experimentos de infecção por competição *in vivo*, em que T4 e seu mutante isogênico *T4Δ (rrgA-srtD)* foram misturados em uma proporção de 1:1, antes da infecção intranasal. O índice competitivo (CI) foi calculado, como descrito abaixo; cada círculo representa o CI para um camundongo individual em cada conjunto de experimentos de competição. Um CI abaixo de 1 indica uma desvantagem competitiva do mutante em relação à cepa do tipo selvagem. Os valores do CI $< 10^{-4}$ foram ajustados para 10^{-4} . Todos os camundongos foram colonizados. (C) CI na colonização, pneumonia e bacteremia após ataque de dose alta ($n = 20$). De 20 camundongos, somente 14 apresentaram pneumonia (definida como bactérias recuperadas dos pulmões) e 14 apresentaram bacteremia. (D) CI na colonização após ataque com dose média ($n = 10$). De 10 camundongos, somente 5 apresentaram pneumonia e apenas 1 apresentou bacteremia. (E) CI na colonização após ataque com dose baixa ($n = 10$). De 10 camundongos, somente 4 apresentaram pneumonia e nove desenvolveram bacteremia. (F) CI na colonização e pneumonia após com infecção mista com D39 do tipo selvagem e seu derivado por inserção isogênico de ilha de fímbrias *D39V (rrgA-srtD)* ou *D39V (rrgA-srtD) Δ (rlrA)* com o gene *rlrA* inativado. Um CI acima de 1 indica um ganho de virulência pela presença da ilha *rlrA* em *D39V (rrgA-srtD)*.

Fig. 6. Papel da ilha de fímbrias *rlrA* na resposta inflamatória sistêmica do hospedeiro. Os camundongos foram atacados i.p. com dose de ataque alta (5×10^6 a 2×10^7 cfu) de T4, ST162^{19F} e seus mutantes isogênicos *T4Δ (rrgA-srtD)* e ST162^{19F} Δ (*rrgA-srtD*) e mortos em 6 horas após a

infecção. (A) Crescimento bacteriano no sangue após ataque com dose alta i.p. São mostrados resultados de camundongos individuais. As linhas horizontais representam as medianas, e a análise pelo teste *U* de Mann-Whitney teste não mostra
 5 diferenças significativas ($P > 0,05$). (B) Resposta sérica de TNF. Os dados são apresentados como médias e SEMs. Foi estabelecida a significância estatística pelo teste de *U* Mann-Whitney (**, $P < 0,0001$; *, $P < 0,001$). (C e D) Resposta de TNF para camundongos individuais
 10 correlacionados com os níveis de bacteremia após inoculação com T4 e *T4Δ (rrgA-srtD)* (C) ou *ST162^{19F}* e *ST1621^{9F}Δ (rrgA-srtD)* (D).

Fig. 7. Análise da resposta de IL-6 para os mesmos ataques i.p. mostrados na Fig. 6. O crescimento bacteriano no sangue é mostrado na Fig. 6A. (A) Resposta sérica de IL-
 15 6 em 6 horas após infecção. Os dados são apresentados como médias e SEMs (teste *U* de Mann-Whitney; *, $P < 0,0001$). (B) Resposta de IL-6 para camundongos individuais correlacionada com os níveis de bacteremia após inoculação
 20 com T4 e *T4Δ (rrgA-srtD)*.

A Fig. 8 é uma análise das proteínas estruturais RrgA RrgB e RrgC de fímbrias pneumocócicas T4. 8A é um desenho esquemático de padrões previstos encontrados em proteínas de fímbrias gram-positivas. 8B é uma ilustração de
 25 seqüências de padrões previstos de fímbrias e *E-box* em *S. pneumoniae* (T4), quando presentes. Seqüências de padrões de fímbrias e *E-box* de *Corynebacterium* sp. São mostradas para referência (Ton-That e cols., 2004, *Mol. Microbiol.*, 53: 251-261; Ton-That e Schneewind, 2004, *Trends Microbiol.*,
 30 12: 228-34; Scott e Milner; 2006, *Mol. Microbiol.*, 62: 320-

330). 8C é um resumo de padrões encontrados na T4 pneumocócica RrgA, RrgB e RrgC. 8A e 8C, S: peptídeo sinalizador do terminal N, P: padrão de fímbria, E: E-box, C: padrão de sinalização de triagem da parede celular, M: 5 trecho hidrofóbico e extremidade com carga.

A Fig. 9A revela um gel de poliacrilamida corado com azul Coomassie que mostra uma auto-associação de proteínas RrgA e RrgB purificadas.

10 A Fig. 9B revela um *imunoblot* que mostra a auto-associação de proteínas RrgA e RrgB purificadas.

A Fig. 9C revela uma série de traçados de cromatografia por exclusão de tamanho de proteínas RrgA, RrgB e RrgC purificadas. Foram observados complexos com peso molecular maior para RrgA e RrgB.

15 A Fig. 10A revela um gráfico de linhas que mostra a purificação de fímbrias pneumocócicas T4 nativas, de alto peso molecular, por gradiente de sacarose.

A Fig. 10B revela um traçado que revela a purificação de fímbrias pneumocócicas T4 nativas, de alto peso 20 molecular, por cromatografia por exclusão de tamanho.

A Fig. 10C revela géis de poliacrilamida que mostram os resultados da purificação de fímbrias pneumocócicas T4 nativas, de alto peso molecular. O gel da esquerda mostra os resultados da coloração com prata. O gel da direita 25 mostra um *imunoblot* com anticorpo que se liga especificamente à RrgB.

A Fig. 11A revela os resultados de uma análise de Edmann para determinar a sequência de aminoácidos do terminal N de proteínas das fímbrias (sublinhadas), 30 comparada com a sequência de aminoácidos prevista de RrgB.

O terminal N das proteínas de fímbrias corresponde ao sítio de sinal clivagem da peptidase (/) previsto.

A Fig. 11B revela os resultados de uma análise por espectroscopia de massa de um digerido trípico de fímbrias purificadas de alto peso molecular. Uma seqüência de peptídeo trípico (em itálico) de fímbrias de alto peso molecular (isoladas de um gel de SDS-PAGE) combina com a seqüência de aminoácidos de RrgB prevista (em negrito).

A Fig. 12 mostra bacteremia e mortalidade de camundongos BALB/C imunizados (IP) com anti-soros para fímbrias de HMW (50 µl/camundongo) e atacados (IP) com 260 CFU de T4/camundongo. Uma preparação de fímbria T4Δ serviu como controle negativo. A. Bacteremia em 24 horas pós-ataque. Círculos = valores de CFU por ml de sangue de animais únicos; barras horizontais = média geométrica de cada grupo; linha tracejada = limite de detecção (ou seja, não foram detectados CFUs nas amostras de sangue abaixo da linha tracejada). B. Evolução da mortalidade. Diamantes = dias de sobrevivência de animais únicos, barras horizontais = mediana de dias de sobrevivência de cada grupo; linha tracejada = ponto final da observação (ou seja, animais acima da linha tracejada sobreviveram no ponto final). ctrl = camundongos que receberam somente o adjuvante correspondente mais solução salina; antifímbria = anti-soros para fímbrias purificadas de HMW; anti-soros antifímbria Δ para controle purificado (fímbria T4Δ); * = $P < 0,05$ e ** = $P < 0,01$, em comparação com o grupo de controle correspondente.

A Fig. 13 revela uma série de gráficos que mostram os resultados da ligação de proteínas recombinantes

purificadas (BSA, RrgA, RrgB, RrgC) e fímbrias nativas para BSA e proteínas da matriz extracelular mucina 1, ácido hialurônico, vitronectina, sulfato de condroitina, lactoferrina, colágenos I e IV, laminina, fibronectina e 5 fibrinogênio. BSA serviu como controle negativo. A ligação foi quantificada por ELISA em uma absorbância de 405 nm.

A Fig. 14 revela uma série de gráficos de barras que mostram a indução de citocinas inflamatórias TNF-alfa, IL-12p40 e IL-6 por células mononucleares (PBMC) e monócitos 10 do sangue periférico atacadas *in vitro* com fímbrias purificadas e uma preparação de controle de fímbrias delta.

A Fig. 15 revela uma microfotografia eletrônica de uma bactéria *Streptococcus pneumoniae* marcada por imuno-ouro com um anticorpo específico para RrgB.

15 A Fig. 16 revela uma microfotografia eletrônica de uma preparação de fímbrias purificadas marcada por imuno-ouro com anticorpos específicos para RrgA (conjugados a partículas de ouro de 15 nm), RrgB (conjugados a partículas de ouro de 5 nm) e RrgC (conjugados a partículas de ouro de 20 10 nm). RrgB é o principal componente da fímbria. RrgA e RrgC são encontradas ao longo do comprimento da fímbria, RrgA sendo encontrada freqüentemente em agrupamentos.

A Fig. 17 revela uma microfotografia eletrônica de fímbrias purificadas coradas negativamente com ácido 25 fosfotúngstico (PTA) e visualizada com um aumento de 5000X.

A Fig. 18 é um diagrama esquemático de análise estrutural das fímbrias para determinar o diâmetro médio das fímbrias.

A Fig. 19 é um diagrama esquemático de análise 30 estrutural das fímbrias para determinar o volume das

fímbrias.

A Fig. 20 é um diagrama esquemático de um método de geração de uma representação 2D aprimorada de uma fímbria pela média e filtração das microfotografias eletrônicas das fímbrias.

A Fig. 21 é um diagrama esquemático de visualizações 2D rodadas de uma fímbria que mostra uma estrutura helicoidal constituída por três protofilamentos.

A Fig. 22 é um diagrama esquemático da determinação de perfis de densidade através da estrutura da fímbria em duas posições.

A Fig. 23 revela um modelo da estrutura de uma fímbria. As fímbrias são feitas por pelo menos 3 "protofilamentos" dispostos em uma estrutura coiled-coil com um diâmetro médio de 10,5-11,0 nm e uma inclinação de 13,2 nm. O diâmetro das fímbrias na posição nodal é de 6,8 nm, e cada "protofilamento" possui um diâmetro de 3,5 nm.

Descrição Detalhada

Os requerentes isolaram e caracterizaram fímbrias de uma bactéria gram-positiva, *Streptococcus pneumoniae* (também conhecido como pneumococo). Essas fímbrias foram identificadas como expressas por TIGR4 de *S. pneumoniae*, um isolado clínico capsular do sorotipo 4, cujo genoma foi seqüenciado pelo "The Institute for Genomic Research" (veja a página da Internet tigr.org). Essas fímbrias são codificadas por uma ilha de patogenicidade, a ilha *rfa*, que está presente em alguns, mas não em todos, isolados clínicos pneumocócicos. Demonstrou-se que as fímbrias são importantes para a aderência pneumocócica às células epiteliais pulmonares, bem como para a colonização em um

modelo murídeo de infecção. Da mesma forma, as fímbrias também demonstraram afetar o desenvolvimento de pneumonia e bacteremia em camundongos. Além disso, pneumococos que expressam fímbria provocaram uma resposta de fator de necrose tumoral (TNF) maior durante infecções sistêmicas do que mutantes isogênicos sem fímbrias, indicando que as fímbrias participam da resposta inflamatória do hospedeiro. Conseqüentemente, essa especificação apresenta, *inter alia*, composições de fímbrias e de proteína de fímbria bacterianas gram-positivas (por exemplo, de *S. pneumoniae*) e uso das mesmas em métodos de tratamento e imunização contra infecções bacterianas gram-positivas (por exemplo, de *S. pneumoniae*).

Fímbrias De *Streptococcus pneumoniae*

As fímbrias pneumocócicas são codificadas por uma ilha *rlrA* presente em TIGR4 de *S. pneumoniae*, que contém 3 sortases e 3 genes que codificam proteínas que contêm padrões LPXTG (*rrgA*, *rrgB* e *rrgC*). A marcação por imunouro com anticorpos contra as proteínas RrgA, RrgB e RrgC detectou estruturas filamentosas alongadas na superfície de *S. pneumoniae*. Demonstrou-se que anti-RrgA marca a superfície da célula bacteriana, o que sugere que RrgA ancora a estrutura da fímbria à parede celular. Verificou-se que anti-RrgB decora toda a fímbria, enquanto anti-RrgC era concentrada nas pontas das fímbrias. A eliminação dos genes de fímbria eliminou a coloração das fímbrias, enquanto a eliminação de um regulador negativo do óperon da fímbria (*mgrA*) gerou uma quantidade aumentada de fímbrias na superfície da célula. A localização da superfície da célula das fímbrias de *S. pneumoniae* a torna atrativa como

antígenos.

As fímbrias foram isoladas até a homogeneidade ou quase homogeneidade de TIGR4 de *S. pneumoniae*, e mostraram massas moleculares que variam de 2×10^6 a 3×10^6 Da. As fímbrias purificadas estavam presentes como filamentos alongados com comprimento de até cerca de 1 μ m e cerca de 10 nm de diâmetro. A marcação por imuno-ouro detectou tanto as proteínas RrgB quanto as RrgC nas fímbrias isoladas.

Uma sequência de ácidos nucleicos de *rrgA* exemplar
10 (Anotação TIGR N° Sp0462) é aqui fornecida:

[illegible]

GAAGTAGAACAGAACACAGTGC GCGACTTCCCGATTCTTAAGATTCGTGATGTGCC
 AAGTATCCAGAAATCACAATTTCAAAGAGAAAAAACTTGGTGACATTGAGTTTAT
 AAGGTCAATAAAAATGATAAAAAACCACTGAGAGGTGCGGTCTTTAGTCTTCAAAA
 CAACATCCGGATTATCCAGATATTTATGGAGCTATTGATCAAAATGGCACTTATCA
 AATGTGAGAACAGGTGAAGATGGTAAGTTGACCTTTAAAAATCTGTCAGATGGGAA
 TATCGATTATTTGAAAATTCTGAACCAGCTGGTTATAAACCCGTTCAAATAAGCC
 ATCGTTGCCTTCCAAATAGTAAATGGAGAAGTCAGAGATGTGACTTCAATCGTTCC
 5 CAAGATATACCAGCGGGTTACGAGTTTACGAATGATAAGCACTATATTACCAATGA
 CCTATTCCTCCAAAGAGAGAATATCCTCGAACTGGTGGTATCGGAATGTTGCCATT
 TATCTGATAGGTTGCATGATGATGGGAGGAGTTCTATTATACACACGGAAACATCC
 TAA (ID. DE SEQ. N°: 1)

Uma sequência de aminoácidos de RrgA exemplar (Anotação
 TIGR N° SP0462) é aqui fornecida:

10 MLNRETHMKKVRKIFQKAVAGLCCISQLTAFSSIVALAETPETS PAIGKVVIKETGE
 GGALLGDAVFELKNNTDGTTVSQRTEAQTGEAIFSNIKPGTYTLTEAQPPVGYKPST
 KQWTVVEVEKNGRRTTVQGEQVENREEALS DQYPQTGTYPDVQTPYQIIKVDGSEKNGQ
 HKALNPNPYERVIEGTL SKRIYQVNNLDDNQYGIELTVSGKTVYEQKDKSVPLDVV
 ILLDNSNSMSNIRNKNARRAERAGEATRSLIDKITSDSENVALVTYASTIFDGTEF
 TVEKGVADKNGKRLNDSLFWNYDQTSFTTNTKDYSYLKLTNDKNDIVELKNKVPTEA
 EDH DGNRLMYQFGATFTQKALMKADEILTQOARONSQKVI FHITDGVPTMSYPINFN
 HATFAPS YQNQLNAFFSKSPNKDGILLSDFITQATS GEHTIVRGDGQSYQMFTDKTV
 YEKGA PAAPVPKPEKYSEMKAAGYAVIGDPINGGYIWLNWRESILAYPFNSNTAKIT
 15 NHGDPTRWYNGNIAPDGYDVFTV GIGINGDPGTDEATATSEFMQSIS SKPENYTNVT
 DTTKILEQLNRYFHTIVTEKKSIENGTITDPMGELIDLQLGTDGRFDPADYTLTAND
 GSRLENGQAVGGPQNDGGLLKNKAVLYDTTEKRIRVTGLYLGTDEKVTLTYNVRLND
 EFVSNKFYDTNGRTTLHPKEVEQNTVRDFPIPKIRDVRKYPEITISKEKKLG DIEFI
 KVNKNDKKPLRGAVFSLQKQHPDYFDIYG AIDQNGTYQNVRTGEDGKLTFKNLS DGK
 YRLFENSEPAGYKPVQNKPIVAFQIVNGEVRDVT SIVPQDIPAGYEFTNDKHYITNE
 PIPPKREYPTGGIGMLPFYLIGCM MMGGVLLYTRKHP (ID. DE SEQ. N°: 2)

RrgA contém um padrão de substrato de sortase YPXTG
 20 (ID. DE SEQ. N°: 8), mostrado em sublinhado no ID. DE SEQ.
 N°: 2, acima. Dois supostos domínios da proteína Cna do
 tipo B (Deivanayagam e cols., 2000, *Structure*, 8: 67-78)
 foram identificados nos resíduos de aminoácidos 62-132 e
 751-824 do ID. DE SEQ. N°: 2. Um suposto domínio do fator
 25 de von Willebrand do tipo A foi identificado (Sadler, 1998,
Annu. Rev. Biochem., 67: 395-424; Ponting e cols., 1999, *J.*
Mol. Biol., 289: 729-4 226-579). Esse domínio do fator de
 von Willebrand do tipo A pode estar envolvido nas
 propriedades de mediação da adesão celular ou de
 30 sinalização celular de fímbrias de *S. pneumoniae*.

Uma sequência de ácidos nucleicos de *rrgB* exemplar

(Anotação TIGR N° sp0463) é aqui fornecida:

5 ATGAAATCAATCAACAAATTTTAAACAATGCTTGCTGCCTTATTACTGACAGCGAGT
 AGCCTGTTTTTCAGCTGCAACAGTTTTTTCGGGCTGGGACGACAACAACATCTGTTACC
 GTTCATAAACTATTGGCAACAGATGGGGATATGGATAAAATTGCAAATGAGTTAGAA
 ACAGGTAACATATGCTGGTAATAAAGTGGGTGTTCTACCTGCAAATGCAAAAGAAATT
 10 GCCGGTGTATATGTTTCGTTTTGGACAAATACTAATAATGAAATTATTGATGAAAATGGC
 CAAACTCTAGGAGTGAATATTGATCCACAAACATTTAAACTCTCAGGGGCAATGCCG
 GCAACTGCAATGAAAAAATTAACAGAAGCTGAAGGAGCTAAATTTAACACGGCAAAT
 TTACCAGCTGCTAAGTATAAAATTTATGAAATTCACAGTTTATCAACTTATGTCGGT
 GAAGATGGAGCAACCTTAACAGGTTCTAAAGCAGTTCCAATTGAAATTGAATTACCA
 TTGAACGATGTTGTGGATGCGCATGTGTATCCAAAAAATACAGAAGCAAGCCAAAA
 ATTGATAAAGATTTCAAAGGTAAAGCAAATCCAGATACACCACGTGTAGATAAAGAT
 ACACCTGTGAACCACCAAGTTGGAGATGTTGTAGAGTACGAAATTGTTACAAAAATT
 CCAGCACTTGCTAATTATGCAACAGCAAACCTGGAGCGATAGAATGACTGAAGGTTTG
 GCATTCAACAAAGGTACAGTGAAAGTAACTGTTGATGATGTTGCACTTGAAGCAGGT
 15 GATTATGCTCTAACAGAAGTAGCAACTGGT'TTTGATTTGAAATTAACAGATGCTGGT
 TTAGCTAAAGTGAATGACCAAAACGCTGAAAAAACTGTGAAATCACTTATTCGGCA
 ACATTGAATGACAAAGCAATTGTAGAAGTACCAGAATCTAATGATGTAACATTTAAC
 TATGGTAATAATCCAGATCACGGGAATACTCCAAAGCCGAATAAGCCAAATGAAAAAC
 GGCGATTTGACATTGACCAAGACATGGGTGATGCTACAGGTGCACCAATTCCGGCT
 GGAGCTGAAGCAACGTTTCGATTTGGTTAATGCTCAGACTGGTAAAGTTGTACAAACT
 GTAACTTTGACAACAGACAAAAATACAGTTACTGTAAACGGATTGGATAAAAAATACA
 GAATATAAATTCGTTGAACGTAGTATAAAAGGGTATTCAGCAGATTATCAAGAAATC
 20 ACTACAGCTGGAGAAATTGCTGTCAAGAACTGGAAACACCAAAATCCAAACCACTT
 GATCCAACAGAGCCAAAAGTTGTTACATATGGTAAAAAGTTTGTCAAAGTTAATGAT
 AAAGATAATCGTTTAGCTGGGGCAGAATTTGTAATTGCAATGCTGATAATGCTGGT
 CAATATTTAGCACGTAAAGCAGATAAAGTGAGTCAAGAAGAGAAGCAGTTGGTTGTT
 ACAACAAAGGATGCTTTAGATAGAGCAGTTGCTGCTTATAACGCTCTTACTGCACAA
 CAACAAACTCAGCAAGAAAAAGAGAAAGTTGACAAAGCTCAAGCTGCTTATAATGCT
 GCTGTGATTGCTGCCAACCAATGCATTTGAATGGGTGGCAGATAAGGACAATGAAAAT
 GTTGTGAAATTAGTTTCTGATGCACAAGGTGCTTTGAAATTACAGGCCCTTCTTGCA
 GGTACATATTACTTAGAAGAAACAAACAGCCTGCTGGTTATGCATTACTAAGTAGC
 25 CGTCAGAAATTTGAAGTCACTGCAACTTCTTATTGAGCGACTGGACAAGGCATTGAG
 TATACTGCTGGTTTCAAGGTAAAGATGACGCTACAAAAGTAGTCAACAAAAAATCACT
 ATCCCAACAAACGGGTGGTATTGGTACAATTATCTTTGCTGTAGCGGGGGCTGCGATT
 ATGGGTATTGCAGTGTACGCATATGTTAAAAACAACAAAGATGAGGATCAACTTGCT
 TAA (SEQ ID NO:3)

Uma sequência de aminoácidos de RrgB exemplar

(Anotação TIGR. N° SP0463) é aqui fornecida:

25 MKSINKFLTMLAALLLTASSLPSAATVFAAGTTTTTSVTVHKLLATDGDMDKIANELE
 TGNYAGNKVGVLPANAKEIAGVMFVWNTNTNBEIIDENGQTLGVNIDPQTFKLSGAMP
 ATAMKKLTEAEGAKFNTANLPAAKYKIYEIHSLSYVGEDGATLTGSKAVPIEIELP
 LNDVVDAAHVYPKNTEAKPKIDKDFKGNANPDTPRVDKDTPVNHQVGDVVEYEIVTKI
 PALANYATANWSDRMTEGLAFNKGTVKTVDDVALEAGDYALTEVATGFDLKLTDAG
 LAKVNDQNAEKTVKITYSATLNDKAIVEVPESNDVTFNYGNPNPDHGNTPKPNKPNEN
 GDLTLTKTWVDATGAPIPAGAEATFDLVNAQTGKVVQTVTLTTDKNTVTVNGLDKNT
 EYKFVERSIKGYSAADYQEITTAGEIAVKNWKDENPKPLDPTEPKVVITYGKKEVKVND
 KDNRLAGAEFVIANADNAGQYLARKADKVSQEEKQLVVTTKDALDRAVAAYNALTAQ
 30 QQTQOEKEKVDKAQAAVNAAVIAANNAFEWVADKDNENVVKLVSDAQGRPEITGLLA
 GTYYLEETKQPAGYALLTSRQKFEVTATSYSATGQGIETYTAGSGKDDATKVVNKKIT
 IPQTGGIGITIIFAVAGAAIMGIAVYAYVKNKDEQDLA (ID. DE SEQ. N°: 4)

RgrB contém um padrão de substrato de sortase IPXTG (ID. DE SEQ. N°: 9), mostrado em sublinhado no ID. DE SEQ. N°: 4, acima. Um suposto domínio da proteína Cna do tipo B (Deivanayagam e cols., 2000, *Structure*, 8: 67-78) foi
 5 identificado nos resíduos de aminoácidos 461-605 do ID. DE SEQ. N°: 4.

Uma sequência de ácidos nucleicos de *rrgC* exemplar (Anotação TIGR N° sp0464) é aqui fornecida:

ATGATTAGTCGTATCTTCTTTGTTATGGCTCTGTGTTTTCTCTTGTATGGGGTGCA
 CATGCAGTCCAAGCGCAAGAAGATCACACGTTGGTCTTGCAATTGGAGAACTATCAG
 10 GAGGTGGTTAGTCAATTGCCATCTCGTGATGGTCATCGGTTGCAAGTATGGAAGTTG
 GATGATTTCGTATTCCTATGATGATCGGGTGCAAATTGTAAGAGACTTGCATTTCGTGG
 GATGAGAAATAAACTTTCTTCTTTCAAAAAGACTTCGTTTGAGATGACCTTCCTTGAG
 AATCAGATTGAAGTATCTCATATTCCAAATGGTCTTTACTATGTTTCGCTCTATTATC
 CAGACGGATGCGGTTTCTTATCCAGCTGAATTTCTTTTTGAAATGACAGATCAAACG
 GTAGAGCCTTTGGTCATTGTAGCGAAAAAACAGATACAATGACAACAAAGGTGAAG
 CTGATAAAGGTGGATCAAGACCACAATCGCTTGGAGGGTGTGCGGCTTTAAATTGGTA
 TCAGTAGCAAGAGATGTTTTCTGAAAAGAGGTTCCCTTGATTGGAGAATACCGTTAC
 AGTTCTTCTGGTCAAGTAGGGAGAACTCTCTATACTGATAAAAATGGAGAGATTTTT
 15 GTGACAAATCTTCCTCTTGGGAAGTATCGTTTCAAGGAGGTGGAGCCACTGGCAGGC
 TATGCTGTTACGACGCTGGATACGGATGTCCAGCTGGTAGATCATCAGCTGGTGACG
 ATTACGGTTGTCAATCAGAAATTACCACGTGGCAATGTTGACTTTATGAAGGTGGAT
 GGTGGGACCAATACCTCTCTTCAAGGGGCAATGTTCAAAGTCATGAAAGAAGAAAGC
 GGACACTATACTCCTGTTCTTCAAAATGGTAAGGAAGTAGTTGTAACATCAGGGAAA
 GATGGTCGTTTCCGAGTGGAAGGTCTAGAGTATGGGACATACTATTTATGGGAGCTC
 CAAGCTCCAACTGGTTATGTTCAATTAACATCGCCTGTTTCCTTTACAATCGGGAAA
 GATACTCGTAAGGAAGTGGTAACAGTGGTTAAAAATAACAAGCGACCACGGATTGAT
 GTGCCAGATACAGGGGAAGAAACCTTGATATCTTGATGCTTGTTGCCATTTTGTG
 20 TTTGGTAGTGGTTATTATCTTACGAAAAAACCAATAACTGA (ID. DE SEQ. N°:5)

Uma sequência de aminoácidos de *RrgC* exemplar (Anotação TIGR. N° SP0464) é aqui fornecida:

MISRIFFVMALCFSLVWGAHAVQAQEDHTLVLQLENYQEVVSOLPSRDGHRLOVWKL
 DDSYSYDDRVOIVRDLHSWDENKLSSFKKTSFEMTFLENQIEVSHIPNGLYYVRSII
 QDAVSYPAEFLFEMTDQTVEPLVIVAKKTDIMTTKVKLKVDQDHNRLLEGVGFKL
 SVARDVSEKEVPLIGEYRYSSSGQVGRITLYTDKNGEIVFTNLPLGNRYRFKEVEPLAG
 25 YAVTTLDTDVQLVDHQLVTITVVNQKLPRGNVDFMKVDGRNTSLQGAMFKVMKEES
 GHYTPVLQNGKEVVVTSGKDGRFRVEGLEYGTYLWELQAPTGYVQLTSPVSFTIGK
 DTRKELVTVVKNNKRPRIDVPPDTEETLYILMLVAILLFGSGYYLTKKPN
 (ID. DE SEQ. N°: 6)

Dois supostos domínios da proteína Cna do tipo B (Deivanayagam e cols., 2000, *Structure*, 8:67-78) foram
 30 identificados nos resíduos de aminoácidos 163-251 e 273-352

do ID. DE SEQ. N°: 6. RrgC contém um padrão de substrato de sortase VPXTG (ID. DE SEQ. N°: 10), mostrado em sublinhado no ID. DE SEQ. N°: 6, acima.

Outras fímbrias bacterianas gram-positivas

5 Os métodos e composições aqui descritos podem ser usados com fímbrias de qualquer bactéria gram-positiva. Foram identificadas proteínas de fímbrias conhecidas e presumíveis em GAS (por exemplo, *Streptococcus pyogenes*) (Mora e cols., 2005, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102:1
10 5.641-6), GBS (por exemplo, *Streptococcus agalactiae*) (Lauer e cols., 2005, *Science*, 309: 105; WO 2006/078318), *Actinomycetes naeslundii* (Yeung e cols., 1998, *Infect. Immun.*, 66: 148-291), *Corynebacterium diphtheriae* (Ton-That e cols., 2003, *Mol. Microbiol.*, 50: 1.429-38; Ton-That e
15 Schneewind, 2004, *Trends. Microbiol.*, 12: 228-34), *Clostridium perfringens* e *Enterococcus faecalis*.

Fímbrias de outras bactérias gram-positivas podem ser usadas nos métodos e composições aqui descritos. Essas bactérias gram-positivas incluem, sem limitação,
20 firmicutes, tais como aqueles dos gêneros *Streptococcus* (por exemplo, *S. pneumoniae*, *S. agalactiae*, *S. pyogenes*, *S. suis*, *S. zooepidemicus*, *S. viridans*, *S. mutans*, *S. gordonii*, *S. equi*), *Bacillus* (por exemplo, *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. subtilis*), *Listeria* (por exemplo, *L. innocua*, *L.*
25 *monocytogenes*), *Staphylococcus* (por exemplo, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. caprae*, *S. saprophyticus*, *S. lugdunensis*, *S. schleiferi*), *Enterococcus* (por exemplo, *E. faecalis*, *E. faecium*), *Lactobacillus*, *Lactococcus* (por exemplo, *L. lactis*), *Leuconostoc* (por exemplo, *L. mesenteroides*),
30 *Pectinatus*, *Pediococcus*, *Acetobacterium*, *Clostridium* (por

exemplo, *C. botulinum*, *C. difficile*, *C. perfringens*, *C. tetani*), *Ruminococcus* (por exemplo, *R. albus*), *Heliobacterium*, *Heliospirillum* e *Sporomusa*; e actinobactérias, tais como aquelas dos gêneros

5 *Actinomycetes* (por exemplo, *A. naeslundii*), *Corynebacterium* (por exemplo, *C. diphtheriae*, *C. efficiens*), *Arthrobacter*, *Bifidobacterium* (por exemplo, *B. longum*), *Frankia*, *Micrococcus*, *Micromonospora*, *Mycobacterium* (por exemplo, *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M.*

10 *microti*), *Nocardia* (por exemplo, *N. asteroides*), *Propionibacterium* e *Streptomyces* (por exemplo, *S. somaliensis*, *S. avermitilis*, *S. coelicolor*).

Fímbrias isoladas

Fímbrias gram-positivas isoladas (por exemplo, de *S.*

15 *pneumoniae*) e outras estruturas semelhantes a fímbria que incluem proteínas de fímbrias gram-positivas (por exemplo, RrgA, RrgB e RrgC), ou fragmentos ou variantes destas, podem ser usadas nos métodos aqui descritos e como antígenos em composições imunogênicas para a produção de

20 anticorpos e/ou a estimulação de uma resposta imunológica em um indivíduo. Fímbrias que incluem variantes de proteínas de fímbria gram-positiva também podem ser usadas nos métodos aqui descritos e como antígenos em composições imunogênicas para a produção de anticorpos e/ou a

25 estimulação de uma resposta imunológica em um indivíduo. Um polipeptídeo de uma semelhante a fímbria gram-positiva (por exemplo, de *S. pneumoniae*) que contém pelo menos 80% de identidade de seqüência, por exemplo, 85%, 90%, 95%, 98% ou 99%, com uma seqüência de aminoácidos de uma proteína gram-

30 positiva (por exemplo, ID. DE SEQ. N°: 2, 4 ou 6), também é

útil nos novos métodos. Além disso, um polipeptídeo de fímbria gram-positiva com até 50, por exemplo, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30 ou 40 inserções, deleções ou substituições de aminoácidos, por exemplo, substituições conservativas de aminoácidos, será útil nas composições e nos métodos aqui descritos.

A determinação do percentual de identidade entre duas seqüências de aminoácidos pode ser obtida com a utilização do programa BLAST 2.0, que está disponível ao público em ncbi.nlm.nih.gov/BLAST. A comparação de seqüências é realizada com o uso de um alinhamento sem lacunas e utilizando-se os parâmetros padronizados (matriz BLOSUM 62, custo de existência de lacuna [gap] de 11, por custo de lacuna de resíduo de 1, e uma proporção lambda de 0,85). O algoritmo matemático usado nos programas BLAST é descrito em Altschul e cols., 1997, *Nucleic Acids Research*, 25: 3.389-3.402.

Como aqui usado, o termo "substituição conservativa de aminoácido" significa uma substituição de um aminoácido em um polipeptídeo dentro de uma família de aminoácidos. Famílias de aminoácidos são reconhecidas na técnica e se baseiam nas propriedades físicas e químicas das cadeias laterais do aminoácido. Famílias incluem as seguintes: aminoácidos com cadeias laterais básicas (por exemplo, lisina, arginina e histidina); aminoácidos com cadeias laterais ácidas (por exemplo, ácido aspártico e ácido glutâmico); aminoácidos com cadeias laterais polares não carregadas (por exemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina e cisteína); aminoácidos com cadeias laterais não polares (por exemplo, alanina, valina,

leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina e triptofano); aminoácidos com cadeias laterais ramificadas (por exemplo, treonina, valina e isoleucina); e aminoácidos com cadeias laterais aromáticas (por exemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano e histidina). Um aminoácido pode pertencer a mais de uma família.

Em algumas modalidades, as composições imunogênicas da invenção compreendem uma proteína de uma fímbria gram-positiva (por exemplo, de *S. pneumoniae*), que pode ser formulada ou purificada em uma forma oligomérica (fímbria). Em algumas modalidades, a forma oligomérica é um hiperoligômero. Em algumas modalidades as composições imunogênicas da invenção compreendem uma proteína de fímbria gram-positiva que foi isolada em uma forma oligomérica (fímbria). As estruturas de oligômero ou hiperoligômero da fímbria que compreendem proteínas de fímbria gram-positiva podem ser purificadas ou de algum outro modo formuladas para uso em composições imunogênicas.

Uma ou mais seqüências de polinucleotídeos do quadro de leitura aberta da proteína da fímbria de *S. pneumoniae* podem ser substituídas por uma seqüência de polinucleotídeos que codifica um fragmento do ORF substituído. Alternativamente, um ou mais dos quadros de leitura aberta da proteína da fímbria de *S. pneumoniae* podem ser substituídos por uma seqüência que possui homologia de seqüência para o ORF substituído.

Uma ou mais das seqüências da proteína de fímbria gram-positiva (por exemplo, de *S. pneumoniae*) tipicamente incluem um padrão LPXTG (por exemplo, LPXTG (ID. DE SEQ. N°: 11)) ou outro padrão de substrato de sortase. O padrão

de substrato de sortase LPXTG de uma fímbria da proteína de *S. pneumoniae* pode ser geralmente representado pela fórmula $X_1X_2X_3X_4G$, em que X na posição de aminoácido 1 é um L, um V, um E, um Y, um I ou um Q, em que X na posição de aminoácido 2 é um P, caso X na posição de aminoácido 1 seja um L, em que X na posição de aminoácido 2 é um V, caso X na posição de aminoácido 1 seja um E ou um Q, em que X na posição de aminoácido 2 é um V ou um P, caso X na posição de aminoácido 1 seja um V, em que X na posição de aminoácido 3 é qualquer resíduo de aminoácido, em que X na posição de aminoácido 4 é um T, caso X na posição de aminoácido 1 seja um V, E ou Q, e em que X na posição de aminoácido 4 é um T, S ou A, caso X na posição de aminoácido 1 seja um L. Alguns exemplos de padrões LPXTG incluem YPXTG (ID. DE SEQ. N°: 8), IPXTG (ID. DE SEQ. N°: 9), LPXSG (ID. DE SEQ. N°: 57), VVXTG (ID. DE SEQ. N°: 12), EVXTG (ID. DE SEQ. N°: 13), VPXTG (ID. DE SEQ. N°: 10), QVXTG (ID. DE SEQ. N°: 14), LPXAG (ID. DE SEQ. N°: 15), QVPTG (ID. DE SEQ. N°: 16) e FPXTG (ID. DE SEQ. N°: 17).

Uma ou mais das seqüências da proteína de fímbria gram-positiva (por exemplo, de *S. pneumoniae*) podem incluir uma seqüência de padrão de fímbrias. Alguns exemplos de seqüências de padrão de fímbrias incluem

	WLQDVHVYPKHQXXXXXXXXK	(ID. DE SEQ. N°: 58),
25	WNYNVVAYPKNTXXXXXXXXK	(ID. DE SEQ. N°: 59),
	WLYDVNVFPKNGXXXXXXXXK	(ID. DE SEQ. N°: 60),
	WIYDVHVYPICNEXXXXXXXXXK	(ID. DE SEQ. N°: 61),
	WNYNVHVYPKNTXXXXXXXXK	(ID. DE SEQ. N°: 62),
	FLSEINIYPKNVXXXXXXXXK	(ID. DE SEQ. N°: 63), e
30	DVVDAAHVYPKNTXXXXXXXXK	(ID. DE SEQ. N°: 64). Uma seqüência de

consenso de padrão de fímbrias exemplar é (W/F/E/D)-X-X-X-(V/I/A)-X-(V/I/A)-(Y/F)-P-K-(N/H/D)-XXXXXXX-(KJL) (ID. DE SEQ. N°: 65) ou WXXXVXVYPK (ID. DE SEQ. N°: 76). A lisina interna conservada do padrão de fímbrias pode atuar como um
 5 nucleófilo na reação de sortase.

Uma ou mais das seqüências da proteína de fímbria gram-positiva (por exemplo, de *S. pneumoniae*) podem incluir uma seqüência de padrão *E-box*. Alguns exemplos de seqüências de padrão *E-box* incluem FCLVETATASGY (ID. DE
 10 SEQ. N°: 66), FCLKETKAPAGY (ID. DE SEQ. N°: 67), YVLVETEAPTGF (ID. DE SEQ. N°: 68), YCLVETKAPYGY (ID. DE SEQ. N°: 69), YKLKETKAPYGY (ID. DE SEQ. N°: 70), YPITEEVAPSGY (ID. DE SEQ. N°: 71), YRLFENSEPAGY (ID. DE SEQ. N°: 72), YYLWELQAPTGY (ID. DE SEQ. N°: 73) e
 15 YYLEETKQPAGY (ID. DE SEQ. N°: 74). Uma seqüência de consenso de padrão *E-box* exemplar é (Y/F)-X-(L/I)-X-E-T-X-(AJQ/T)-(P/A)-X-G-(Y/F) (ID. DE SEQ. N°: 75) ou LXET (ID. DE SEQ. N°: 77).

As fímbrias gram-positivas (por exemplo, de *S. pneumoniae*) aqui descritas podem afetar a capacidade das
 20 bactérias gram-positivas (por exemplo, *S. pneumoniae*) de se aderirem e invadir as células epiteliais. As fímbrias também podem afetar a capacidade de bactérias gram-positivas (por exemplo, *S. pneumoniae*) para se deslocar
 25 através de uma camada da célula epitelial. De preferência, uma ou mais fímbrias gram-positivas são capazes de se ligar ou de algum outro modo se associar à superfície de uma célula epitelial. Fímbrias gram-positivas também podem ser
 30 capazes de se ligar ou se associar ao fibrinogênio, fibronectina ou colágeno.

Acredita-se que proteínas de sortases gram-positivas (por exemplo, de *S. pneumoniae*) estejam envolvidas na secreção e ancoragem das proteínas de superfície que contêm LPXTG. As proteínas de sortase de *S. pneumoniae* são
5 codificadas por genes (*srtB*, *srtC* e *srtD*) encontrados na mesma patogenicidade de ilhota que os genes *rrgA*, *rrgB* e *rrgC*. Proteínas sortase e variantes de proteínas sortase úteis nos métodos aqui descritos podem ser obtidas de bactérias gram-positivas.

10 As proteínas de uma fímbria gram-positiva (por exemplo, de *S. pneumoniae*) podem ser anexadas covalentemente à parede celular bacteriana por transpeptidases associadas à membrana, por exemplo, uma sortase. A sortase pode funcionar para clivar a proteína de
15 superfície, preferivelmente entre os resíduos treonina e glicina de um padrão LPXTG. A sortase pode, então, ajudar na formação de uma ligação amida entre o grupo carboxil de treonina e um precursor da parede celular como, por exemplo, lipídeo II. O precursor pode então ser incorporado
20 no peptidoglicano por meio das reações de transglicosilação e transpeptidação da síntese da parede bacteriana. Veja Comfort e cols., *Infection & Immunity* (2004) 72(5): 2.710 - 2.722.

Em algumas modalidades, a invenção inclui uma
25 composição que compreende estruturas oligoméricas semelhantes a fímbria que compreendem uma proteína de uma fímbria gram-positiva (por exemplo, de *S. pneumoniae*) (por exemplo, RrgA, RrgB ou RrgC (por exemplo, ID. DE SEQ. N°: 2, 4 ou 6)). A estrutura oligomérica semelhante a fímbria
30 pode compreender numerosas unidades de proteína de fímbria.

Em algumas modalidades, as estruturas oligoméricas semelhantes a fímbria compreendem duas ou mais proteínas de fímbria. Em algumas modalidades, a estrutura oligomérica semelhante a fímbria compreende uma estrutura
5 hiperoligomérica semelhante a fímbria que compreende pelo menos duas (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 150, 200 ou mais) subunidades oligoméricas, em que cada subunidade compreende uma proteína de fímbria
10 ou um fragmento desta. As subunidades oligoméricas podem ser associadas covalentemente por meio de uma lisina conservada dentro de um padrão de fímbrias. As subunidades oligoméricas podem ser associadas covalentemente por meio de um padrão LPXTG, preferivelmente, por meio do resíduo de
15 aminoácido treonina ou serina, respectivamente. Em algumas modalidades, a estrutura oligomérica semelhante a fímbria é uma fímbria isolada.

Proteínas de uma fímbria gram-positiva (por exemplo, de *S. pneumoniae*) ou fragmentos destas a serem incorporadas
20 nas estruturas oligoméricas semelhantes a fímbria da invenção incluirão, em algumas modalidades, um padrão de fímbrias.

A fímbria oligomérica pode ser usada isoladamente ou nas combinações da invenção. Em algumas modalidades, a
25 invenção compreende uma fímbria de *S. pneumoniae* em forma oligomérica. Em algumas modalidades, a fímbria está em uma forma hiperoligomérica.

Métodos de purificação de fímbrias

As fímbrias podem ser purificadas de células, por
30 exemplo, células bacterianas, que expressam fímbrias gram-

positivas ou estruturas semelhantes a fímbria (por exemplo, fímbrias estreptocócicas, tais como fímbrias de *S. pneumoniae*, estreptococos do grupo A e estreptococos do grupo B) por separação das fímbrias das células, por exemplo, por cisalhamento mecânico ou digestão enzimática, e o isolamento das fímbrias separadas.

Células bacterianas adequadas à purificação de fímbrias incluem cepas bacterianas gram-positivas fimbriadas, bactérias gram-positivas não fimbriadas que foram transformadas com uma ou mais proteínas da fímbria gram-positiva, por exemplo, RrgA, RrgB e RrgC de *S. pneumoniae* (por exemplo, IDS. DE SEQ. N^{os}: 2, 4 e 6), e células gram-negativas ou outras células transformadas com uma ou mais proteínas da fímbria gram-positiva, por exemplo, RrgA, RrgB e RrgC de *S. pneumoniae* (por exemplo, IDS. DE SEQ. N^{os}: 2, 4 e 6). Tipicamente, uma célula usada para purificação de fímbrias produzirá apenas o tipo ou tipos de fímbrias desejados, por exemplo, fímbrias endógenas ou heterólogas. Para a produção de fímbrias heterólogas, a célula pode ser alterada, por exemplo, por mutação ou métodos de DNA recombinante, de modo a não produzir fímbrias endógenas. Tipicamente, uma célula bacteriana gram-positiva produtora de fímbrias útil à purificação expressará uma ou mais sortases compatíveis, de forma que as fímbrias sejam expressas na superfície da célula.

A separação de fímbrias de células bacterianas gram-positivas é tipicamente obtida por cisalhamento mecânico, digestão enzimática, diminuição ou inibição da atividade de SrtA, ou tratamento com um composto que interfere com a

integridade da parede celular. O cisalhamento mecânico pode remover fisicamente as fímbrias das células, enquanto outros métodos podem eliminar o ponto de adesão das fímbrias (por exemplo, por degradação de componentes da
 5 parede celular ou da fímbria). Após a separação das fímbrias das células, as fímbrias e as células podem ser separadas, por exemplo, por centrifugação.

Exemplos não limitantes de métodos de cisalhamento mecânico incluem ultrassonificação, cisalhamento com
 10 glóbulo de vidro e mistura. Métodos de sonificação são discutidos, por exemplo, em Yamaguchi e cols., 2004, *Current Microbial.*, 49:59-65. Métodos de cisalhamento com glóbulo de vidro são discutidos, por exemplo, em Levesque e cols., 2001, *J. Bacteriol.*, 183: 2.724-32. Métodos gerais
 15 de cisalhamento mecânico são discutidos, por exemplo, em Wolfgang e cols., 1998, *Mol. Microbiol.*, 29: 321-30; Trachtenberg e cols., 2005, *J. Mol. Biol.*, 346: 665-676; Parge e cols., 1990, *J. Biol. Chem.*, 265: 2.278-85; Isaacson e cols., 1981, *J. Bacteriol.*, 146: 784-9; Korhonen
 20 e cols., 1980, *Infect. Immun.*, 27: 569-75; Hahn e cols., 2002, *J. Mol. Biol.*, 323: 845-57; St. Geme e cols., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 11.913-18; Weber e cols., 2005, *J. Bacteriol.*, 187: 2.458-68; e Mu e cols., 2002, *J. Bacteriol.*, 184: 4.868-74.

25 Exemplos não limitantes de enzimas adequadas à digestão enzimática incluem enzimas de degradação da parede celular como, por exemplo, mutanolisina, lisostafina e lisozimas. Métodos de digestão enzimática são discutidos, por exemplo, em Bender e cols., 2003, *J. Bacteriol.*, 185:
 30 6.057-66; Ton-That e cols., 2004, *Mol. Microbial.*, 53: 251-

61; e Ton-That e cols., 2003, *Mol. Microbial.*, 50: 1.429-38. Para administração de fímbrias aos indivíduos, pode-se utilizar várias enzimas para remover componentes da parede celular que possam causar uma reação indesejada ao hospedeiro.

Exemplos não limitantes de métodos de inibição ou diminuição da atividade de SrtA incluem a diminuição da atividade de SrtA por introdução de um alelo de "perda de função" de SrtA, eliminação do gene SrtA endógeno, expressão de um ácido nucléico que diminui a expressão de SrtA (por exemplo, um anti-senso ou miRNA), e o tratamento das células com um composto que inibe a atividade de SrtA (veja, por exemplo, Marrafini e cols., *Microbial. Mol. Biol. Rev.*, 70: 192-221, 2006).

Inibidores da sortase A exemplares incluem metano-tiosulfonatos (por exemplo, MTSET e (2-sulfonatoetil) metano-tiosulfonato) (Ton-That e Schneewind, *J. Biol. Chem.*, 274: 24.316-24.320, 1999), ácido p-hidroximercuribenzóico, glucosilesterol β -sitosterol-3-O-glicopiranol (Kim e cols., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67: 2.477-79, 2003), cloreto de berberina (Kim e cols., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68: 421-24, 2004), peptidil-diazometano (LPAT-CHN₂) (Scott e cols., *Biochem. J.*, 366: 953-58, 2002), peptidil-clorometano (LPAT-CH₂Cl), peptidil-vinil sulfona [LPAT-SO₂(Ph)] (Conolly e cols., *J. Biol. Chem.*, 278: 3.4061-65, 2003), vinil sulfonas (por exemplo, di-, etil-, metil- e fenil vinil sulfonas) (Frankel e cols., *J. Am. Chem. Soc.*, 126: 3.404-3.405, 2004), peptídeos do padrão LPXTG com o resíduo treonina substituído por um grupo fosfinato (por exemplo, LPEV

{PO₂H.CH₂}G) (Kruger e cols., *Bioorg. Med. Chem.*, 12: 3.723-29, 2004), (Z)-diaril-acrilonitrilas substituídas (Oh e cols., *J. Med. Chem.*, 47: 2.418-21, 2004), e extratos de várias plantas medicinais (Kim e cols., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66: 2.751-54, 2002).

Exemplos não limitantes de compostos que interferem com a integridade da parede celular incluem glicina e antibióticos como, por exemplo, penicilinas (por exemplo, metecilina, amoxicilina, ampicilina), cefalosporinas (por exemplo, cefalexina, cefproxil, cefepima), glicopeptídeos (por exemplo, vancomicina, teicoplanina, ramoplanina) e ciclosserina.

Fímbrias separadas podem ser separadas de outros componentes por densidade, por exemplo, pela utilização de centrifugação por gradiente de densidade. Por exemplo, as fímbrias podem ser separadas por centrifugação em um gradiente de sacarose.

Tipicamente, uma amostra contendo fímbrias gram-positivas conterá polímeros de diferentes pesos moleculares em função de diferentes números de subunidades de proteína de fímbria presentes nas fímbrias. Para reduzir a polidispersibilidade, uma amostra contendo fímbrias gram-positivas pode ser separada por tamanho. Por exemplo, pode ser usada uma coluna de filtração em gel ou exclusão por tamanho. Uma membrana de ultrafiltração também pode ser usada para reduzir a polidispersibilidade de fímbrias gram-positivas.

As fímbrias gram-positivas também podem ser isoladas com o uso de métodos de afinidade como, por exemplo, cromatografia por afinidade. Uma proteína que se liga

especificamente a uma fímbria gram-positiva, por exemplo, um anticorpo que se liga especificamente a um componente da fímbria ou um anticorpo que se liga preferencialmente às fímbrias, pode ser imobilizado em um substrato sólido (por exemplo, um substrato de cromatografia) e uma amostra contendo fímbrias gram-positivas exposta à proteína de ligação imobilizada. Esses métodos de isolamento por afinidade também podem ser usados para isolar, purificar ou enriquecer preparações de células que expressam fímbrias gram-positivas.

Fímbrias gram-positivas também podem ser isoladas com o uso de qualquer outro método de purificação de proteína conhecido na técnica, por exemplo, precipitações, métodos de cromatografia em coluna e concentrações de amostra. O isolamento pode incluir, por exemplo, cromatografia por filtração em gel, cromatografia por troca iônica, cromatografia de fase reversa ou cromatografia por afinidade. Métodos adicionais são descritos, por exemplo, em Ruffolo e cols., 1997, *Infect. Immun.*, 65: 339-43. Métodos de purificação de proteínas são descritos em detalhe, por exemplo, em Scopes, R.K., "Protein Purification: Principles and Practice", 3ª ed., 1994, Springer, NY.

A presença de fímbrias gram-positivas em frações durante purificação pode ser seguida por eletroforese (por exemplo, eletroforese em poliacrilamida), medida da ligação de um agente que se liga especificamente às fímbrias gram-positivas (por exemplo, um anticorpo contra uma proteína da fímbria ou um anticorpo que se liga preferencialmente às fímbrias) e/ou a medida de uma atividade das fímbrias como,

por exemplo, a ligação a proteínas ou células.

Anticorpos

As fímbrias gram-positivas (por exemplo, de *S. pneumoniae*) da invenção também podem ser usadas para a
5 preparação de anticorpos específicos para a fímbria gram-positiva ou para proteínas da fímbria gram-positiva. Em algumas modalidades, os anticorpos se ligam especificamente (por exemplo, preferencialmente) a uma forma oligomérica ou hiperoligomérica de uma proteína de fímbria gram-positiva.
10 A invenção também inclui combinações de anticorpos específicos para proteínas da fímbria gram-positiva selecionadas para fornecer proteção contra uma gama aumentada de isolados de sorotipos de cepas.

Os anticorpos específicos para fímbrias gram-positivas
15 (por exemplo, de *S. pneumoniae*) da invenção incluem uma ou mais porções biológicas que, por meios químicos ou físicos, podem se ligar ou se associar a um epitopo de um polipeptídeo de fímbria gram-positiva. Os anticorpos da invenção incluem anticorpos que se ligam preferencialmente
20 a uma fímbria gram-positiva, quando comparada com proteínas isoladas da fímbria. A invenção inclui anticorpos obtidos de preparações tanto policlonais quanto monoclonais, além dos seguintes: moléculas de anticorpos híbridos (quiméricos) (veja, por exemplo, Winter e cols. (1991)
25 *Nature* 349: 293-299; e Patente U.S. N° 4.816.567); fragmentos $F(ab')_2$ e $F(ab)$; moléculas F_v (heterodímeros não covalentes, veja, por exemplo, Inbar e cols. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 69: 2.659-2.662; e Ehrlich e cols. (1980) *Biochem.* 19: 4.091-4.096); moléculas F_v de cadeia
30 simples (sF_v) (veja, por exemplo, Huston e cols. (1988)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5.897-5.883); fragmentos diméricos e triméricos de construções de anticorpo; *minibodies* (veja, por exemplo, Pack e cols. (1992) *Biochem.* 31: 1.579-1.584; Cumber e cols. (1992) *Immunology* 149B: 5 120-126); moléculas de anticorpo humanizado (veja, por exemplo, Riechmann e cols. (1988) *Nature* 332: 323-327; Verhoevan e cols. (1988) *Science* 239: 1.534-1.536; e Publicação de Patente U.K. N° GB 2.276.169, publicada em 21 de setembro de 1994); e quaisquer fragmentos funcionais 10 obtidos dessas moléculas, em que tais fragmentos retêm as propriedades de ligação imunológica da molécula do anticorpo parente. A invenção ainda inclui anticorpos obtidos por meio de processos não convencionais, por exemplo, exibição de fago.

15 Os anticorpos da presente invenção podem ser policlonais, monoclonais, recombinantes, por exemplo, quiméricos ou humanizados, totalmente humanos, não humanos, por exemplo, murídeos, ou anticorpos de cadeia simples. Métodos de produção desses anticorpos são conhecidos. Em 20 alguns casos, os anticorpos possuem função efetora e podem fixar complemento. Os anticorpos também podem ser acoplados a toxinas, grupos repórteres ou agentes de imagem.

Em algumas modalidades, os anticorpos específicos para a proteína de fímbria gram-positiva da invenção são 25 anticorpos monoclonais. Anticorpos monoclonais incluem uma composição de anticorpo que possui uma população homogênea de anticorpos. Anticorpos monoclonais podem ser obtidos de hibridomas murídeos, bem como de anticorpos humanos monoclonais obtidos com o uso de hibridomas humanos e não 30 murídeos. Veja, por exemplo, Cote, e cols. "Monoclonal

Antibodies and Cancer Therapy", Alan R. Liss, 1985, p 77.

Anticorpos quiméricos, humanizados, por exemplo, completamente humanos, são desejáveis para aplicações que incluem administração repetida, por exemplo, tratamento
5 terapêutico (e algumas aplicações diagnósticas) de um indivíduo humano.

Os anticorpos também podem ser usados no tratamento profilático ou terapêutico de infecção bacteriana gram-positiva (por exemplo, por *S. pneumoniae*). Os anticorpos
10 podem bloquear a adesão ou alguma outra atividade de bactérias gram-positivas em células hospedeiras. Adicionalmente, os anticorpos podem ser usados para liberar uma toxina ou um agente terapêutico como, por exemplo, um antibiótico, às células bacterianas gram-positivas.

15 Os anticorpos podem ser usados em aplicações diagnósticas, por exemplo, para detectar a presença ou ausência de fímbrias gram-positivas ou de proteínas da fímbria gram-positiva em uma amostra biológica. Anticorpos antifímbrias ou antiproteína de fímbria podem ser usados de
20 forma diagnóstica para monitorar os níveis de proteína no tecido como parte de um procedimento de teste clínico, por exemplo, para determinar a eficácia de certo regime de tratamento. A detecção pode ser facilitada por acoplamento (ou seja, ligado fisicamente, por exemplo, direta ou
25 indiretamente) do anticorpo para uma substância detectável (ou seja, marcação do anticorpo). Exemplos de substâncias detectáveis incluem várias enzimas, grupos prostéticos, materiais fluorescentes, agentes de contraste, materiais luminescentes, materiais bioluminescentes e materiais
30 radioativos. Exemplos de enzimas adequadas incluem

peroxidase de raiz-forte, fosfatase alcalina, β -galactosidase e acetilcolinasterase; exemplos de complexos de grupo prostético adequados incluem estreptavidina/biotina e avidina/biotina; exemplos de materiais fluorescentes adequados incluem umbeliferona, fluoresceína, fluoresceína isotiocianato, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloreto de dansila ou ficoeritrina; exemplos de agentes de contraste incluem materiais eletrodensos úteis para microscopia eletrônica, por exemplo, partículas de ouro ou materiais magneticamente ativos úteis para imagens de ressonância magnética, por exemplo, partículas supermagnéticas de ferro; um exemplo de um material luminescente inclui luminol; exemplos de materiais bioluminescentes incluem luciferase, luciferina e *aequorin*, e exemplos de materiais radioativos adequados incluem ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S e ^3H . Esses anticorpos diagnósticos podem ser usados em métodos para detectar a presença de bactérias gram-positivas fimbriadas (por exemplo, *S. pneumoniae*) em um paciente infectado, por exemplo, por teste de uma amostra do paciente. O esquema de tratamento pode então ser selecionado com base na presença ou ausência de bactérias gram-positivas fimbriadas. Por exemplo, um paciente infectado com bactérias gram-positivas não fimbriadas poderia ser tratado com um antibiótico, enquanto um paciente infectado com bactérias gram-positivas fimbriadas também poderia ser tratado um composto de ligação de fímbrias, por exemplo, um anticorpo e/ou um agente antiinflamatório (por exemplo, IL-6 ou um agente anti-TNF como, por exemplo, um anticorpo anti-TNF).

30 Ensaios de rastreamento

Em alguns aspectos; a invenção fornece métodos (aqui também denominados "ensaios de rastreamento") para a identificação de moduladores, ou seja, compostos ou agentes candidatos identificados a partir de um ou mais compostos de teste (por exemplo, anticorpos, proteínas, peptídeos, peptidomiméticos, peptóides, pequenas moléculas inorgânicas, pequenas moléculas orgânicas não ácido nucléico, ácidos nucléicos (por exemplo, ácidos nucléicos anti-senso, siRNA, oligonucleotídeos ou oligonucleotídeos sintéticos) ou outras drogas) que inibem uma atividade, por exemplo, uma atividade de ligação de fímbrias gram-positivas (por exemplo, de *S. pneumoniae*) ou uma proteína de fímbria gram-positiva. Os compostos assim identificados podem ser usados para modular a atividade de ligação ou adesão de bactérias gram-positivas em um protocolo terapêutico, ou para elaborar a função biológica de fímbrias gram-positivas.

Em algumas modalidades, são fornecidos ensaios para o rastreamento de compostos de teste para identificar aqueles que podem se ligar às fímbrias gram-positivas (por exemplo, de *S. pneumoniae*) ou a uma proteína de uma fímbria gram-positiva ou uma porção desta. Compostos que se ligam às fímbrias gram-positivas ou uma proteína de uma fímbria gram-positiva podem ser testados quanto à sua habilidade para modular uma atividade associada às fímbrias gram-positivas como, por exemplo, adesão, infecção ou uma resposta inflamatória.

Os compostos de teste usados nos métodos aqui descritos podem ser obtidos com o uso de várias abordagens em métodos de biblioteca combinatória conhecidos na

técnica, que incluem: bibliotecas biológicas; bibliotecas de peptídeos (bibliotecas de moléculas que possuem as funcionalidades de peptídeos, mas com uma estrutura central não peptídica inédita, que são resistentes à degradação enzimática, mas que, no entanto, permanecem bioativas; veja, por exemplo, Zuckermann e cols., 1994, *J. Med. Chem.*, 37: 2.678-2.685); bibliotecas de fase sólida ou de fase de solução espacialmente localizáveis em paralelo; métodos de biblioteca sintética que exigem a desconvolução; o método de biblioteca de "um glóbulo/um composto"; e métodos de biblioteca sintética que utilizam seleção por cromatografia por afinidade. As abordagens de biblioteca biológica e de biblioteca de peptídeo se limitam a bibliotecas de peptídeos, enquanto as outras quatro abordagens são aplicáveis às bibliotecas de compostos de peptídeos, de oligômero não peptídico ou de pequena molécula (Lam, 1997, *Anticancer Drug Des.*, 12: 145).

Exemplos de métodos para a síntese de bibliotecas moleculares podem ser encontrados na técnica, por exemplo, em: DeWitt e cols. (1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6.909; Erb e cols., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 11.422; Zuckermann e cols., 1994, *J. Med. Chem.*, 37: 2.678; Cho e cols., 1993, *Science*, 261: 1.303; Carrell e cols., 1994, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 33: 2.059; Carrell e cols., 1994, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 33: 2.061; e em Gallop e cols., 1994, *J. Med. Chem.*, 37: 1.233).

Bibliotecas de compostos podem ser apresentadas em solução (por exemplo, Houghten, 1992, *Biotechniques*, 13: 412-421) ou em glóbulos (Lam, 1991, *Nature*, 354: 82-84), chips (Fodor, 1993, *Nature*, 364: 555-556), bactérias

(Ladner, Patente U.S. N° 5.223.409), esporos (Ladner, Patente U.S. N° 5.223.409), plasmídeos (Cull e cols., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 1.865-1.869), ou em fago (Scott e Smith, 1990, *Science*, 249: 386-390; Devlin, 1990, *Science*, 249: 404-406; Cwirla e cols., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 6.378-6.382; Felici, 1991, *J. Mol. Biol.*, 222: 301-310; e Ladner *supra*).

Em algumas modalidades, o ensaio é do tipo com base em células no qual uma célula, por exemplo, uma célula bacteriana que expressa fímbrias gram-positivas (por exemplo, de *S. pneumoniae*) ou uma proteína de fímbrias gram-positivas ou porção biologicamente ativa desta, é colocada em contato com um composto de teste, e a habilidade do composto de teste para modular uma atividade de fímbrias gram-positivas ou de uma proteína de fímbrias gram-positivas é determinada, por exemplo, por monitoramento de ligação celular. A célula, por exemplo, pode ser de origem mamífera, por exemplo, murídea, de rato, ou de origem humana. A célula pode ser uma célula epitelial, por exemplo, uma célula epitelial pulmonar A549.

A habilidade do composto de teste para modular uma atividade de ligação de fímbrias gram-positivas (por exemplo, de *S. pneumoniae*) ou de uma proteína de fímbria gram-positiva e um ligante ou substrato, por exemplo, uma célula ou uma proteína como, por exemplo, fibrinogênio, fibronectina ou colágeno, pode ser avaliada, por exemplo, por acoplamento do composto, por exemplo, o substrato, com um radioisótopo ou marcador enzimático, de tal forma que a ligação do composto, por exemplo, do substrato, às fímbrias gram-positivas ou a uma proteína de fímbria gram-positiva

possa ser determinada por detecção do composto marcado, por exemplo, substrato, em um complexo. Alternativamente, fímbrias gram-positivas ou uma proteína de fímbria gram-positiva podem ser acopladas a um radioisótopo ou marcador 5 enzimático para monitorar a habilidade de um composto de teste para modular a ligação de fímbrias gram-positivas ou de uma proteína de fímbrias gram-positivas a um substrato em um complexo. Por exemplo, os compostos (por exemplo, parceiro de ligação de fímbrias gram-positivas ou de uma 10 proteína de fímbrias gram-positivas) podem ser marcados com um radioisótopo (por exemplo, ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C ou ^3H), direta ou indiretamente, e o radioisótopo detectado por contagem direta de radioemissão ou por contagem de cintilação. Alternativamente, os compostos podem ser marcados 15 enzimaticamente, por exemplo, com peroxidase de raiz-forte, fosfatase alcalina ou luciferase, e o marcador enzimático detectado por determinação da conversão de um substrato apropriado em produto.

A habilidade de um composto para interagir com 20 fímbrias gram-positivas (por exemplo, de *S. pneumoniae*) ou uma proteína de fímbrias gram-positivas, com ou sem a marcação de qualquer um dos participantes pode ser avaliada. Por exemplo, pode ser usado um microfisiômetro para detectar a interação de um composto com fímbrias gram-positivas ou com uma proteína de fímbrias gram-positivas, 25 sem marcação do composto ou das fímbrias gram-positivas ou de uma proteína de fímbrias gram-positivas (McConnell e cols., 1992, *Science* 257: 1.906-1.912). Como aqui usado, um "microfisiômetro" (por exemplo, Cytosensor[®]) é um 30 instrumento analítico que mede a taxa na qual uma célula

acidifica seu ambiente com o uso de um sensor potenciométrico acessível por luz (LAPS). Alterações nessa taxa de acidificação podem ser usadas como um indicador da interação entre um composto e fímbrias gram-positivas ou
5 uma proteína de fímbrias gram-positivas.

Em algumas modalidades, é fornecido um ensaio sem células, no qual uma fímbria gram-positiva (por exemplo, de *S. pneumoniae*), ou uma proteína de fímbria gram-positiva ou porção biologicamente ativa desta, é colocada em contato
10 com um composto de teste, e a habilidade do composto de teste para se ligar à fímbria gram-positiva, ou a uma proteína de fímbria gram-positiva ou porção biologicamente ativa desta, é avaliada. Em geral, porções biologicamente ativas das fímbrias gram-positivas ou de proteínas de
15 fímbrias gram-positivas a serem usadas nos novos ensaios incluem fragmentos que participam em interações com fímbrias gram-positivas ou com moléculas de proteína de fímbrias gram-positivas.

Ensaio sem células envolvem a preparação de uma
20 mistura de reação da proteína do gene-alvo e do composto de teste, sob condições e por um período suficiente para permitir que os dois componentes interajam e se liguem, formando, dessa forma, um complexo que pode ser removido e/ou detectado.

25 A interação entre duas moléculas também pode ser detectada, por exemplo, com o uso de transferência de energia de fluorescência (FET) (veja, por exemplo, Lakowicz e cols., Patente U.S. N° 5.631.169 e Stavrianopoulos e cols., Patente U.S. N° 4.868.103). É selecionado um
30 marcador de fluoróforo na primeira molécula "doadora" de

tal forma que sua energia fluorescente emitida seja absorvida por um marcador fluorescente em uma segunda molécula "receptora", a qual, por sua vez, é capaz de fluorescer em função da energia absorvida.

5 Alternativamente, a molécula "doadora" de proteína pode simplesmente utilizar a energia fluorescente natural de resíduos de triptofano. São escolhidos marcadores que emitem diferentes comprimentos de onda de luz, de tal forma que o marcador da molécula "receptora" possa ser
10 diferenciado da "doadora". Na medida em que a eficiência de transferência de energia entre os marcadores está relacionada à distância que separa as moléculas, o relacionamento espacial entre as moléculas pode ser avaliado. Em uma situação em que ocorre ligação entre as
15 moléculas, a emissão fluorescente do marcador da molécula "receptora" no ensaio deve ser máxima. Um evento de ligação FET pode ser convenientemente medido por meio de meios padronizados de detecção fluorométrica bem conhecidos na técnica (por exemplo, com o uso de um fluorímetro).

20 Em algumas modalidades, a determinação da habilidade de uma fímbria gram-positiva (por exemplo, de *S. pneumoniae*) ou de uma proteína de uma fímbria gram-positiva (por exemplo, de *S. pneumoniae*) para se ligar a uma molécula-alvo (por exemplo, um polipeptídeo de
25 fibrinogênio, fibronectina ou colágeno, ou fragmento destes) pode ser obtida com o uso de Análise de Interação Biomolecular (BIA) em tempo real (por exemplo, Sjolander e cols., 1991, *Anal. Chem.*, 63: 2.338-2.345 e Szabo e cols., 1995, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 5: 699-705). A
30 "ressonância por plasmônio de superfície" ou "BIA" detecta

interações bioespecíficas em tempo real, sem marcação de nenhum dos reagentes (por exemplo, BIAcore). Mudanças na massa na superfície de ligação (indicativas de um evento de ligação) causam alterações do índice refrativo da luz próximo à superfície (o fenômeno óptico de ressonância por plasmônio de superfície (SPR)), produzindo um sinal detectável que pode ser usado como uma indicação de reações em tempo real entre moléculas biológicas.

Em algumas modalidades, o produto gênico-alvo ou a substância de teste é ancorado em uma fase sólida. Os complexos de produto gênico-alvo/composto de teste ancorados na fase sólida podem ser detectados ao final da reação. O produto gênico-alvo pode ser ancorado em uma superfície sólida, e o composto de teste, que não está ancorado, pode ser marcado, direta ou indiretamente, com um marcador detectável aqui discutido.

Vários produtos gênicos-alvo podem ser ancorados em uma fase sólida com o uso da tecnologia de microarranjo de proteína, que também é conhecida por outros nomes, incluindo: tecnologia de chip de proteína e tecnologia de arranjo de proteína de fase sólida. A tecnologia de microarranjo é bem conhecida por aqueles habilitados na técnica e está baseada, sem limitação, na obtenção de um arranjo de peptídeos ou proteínas identificados em um substrato fixado, a ligação de moléculas-alvo ou constituintes biológicos aos peptídeos, e avaliação dessa ligação. Veja, por exemplo, G. MacBeath e S.L. Schreiber, "Printing Proteins as Microarrays for High-Throughput Function Determination", *Science* 289 (5485): 1.760-1.763, 2000. Substratos de microarranjo incluem, sem limitação,

vidro, sílica, aluminossilicatos, borossilicatos, óxidos metálicos, por exemplo, alumina e óxido de níquel, várias argilas, nitrocelulose ou náilon. Os substratos de microarranjo podem ser revestidos com um composto para
5 aumentar a síntese de uma sonda (por exemplo, um peptídeo) no substrato. Agentes ou grupos de acoplamento no substrato podem ser usados para ligar covalentemente o primeiro aminoácido ao substrato. Diversos agentes ou grupos de acoplamento são conhecidos por aqueles habilitados na
10 técnica. Podem ser sintetizadas sondas peptídicas diretamente no substrato em uma tela predeterminada. Alternativamente, sondas peptídicas podem ser salpicadas no substrato e, nesse caso, o substrato pode ser revestido com um composto para aumentar a ligação da sonda ao substrato.
15 Nessas modalidades, sondas pré-sintetizadas são aplicadas ao substrato em um volume e em um padrão de tela predeterminados, precisos, preferivelmente com a utilização de um robô controlado por computador para aplicar a sonda ao substrato de uma forma por impressão por contato ou de
20 uma forma sem contato como, por exemplo, jato de tinta ou liberação piezelétrica. As sondas podem ser ligadas covalentemente ao substrato. Em algumas modalidades, um ou mais peptídeo ou moléculas de proteína de controle são anexados ao substrato. Peptídeo ou moléculas de proteína de
25 controle permitem a determinação de fatores, tais como qualidade e características de ligação do peptídeo ou da proteína, qualidade e eficácia do reagente, sucesso da hibridização e limiares e sucesso da análise.

Em algumas modalidades, é desejável imobilizar as
30 fímbrias gram-positivas (por exemplo, de *S. pneumoniae*) ou

de uma proteína de fímbrias gram-positivas, um anticorpo antifímbria ou antiproteína de fímbria ou uma proteína de ligação de fímbria gram-positiva (por exemplo, um anticorpo) para facilitar a separação de formas em complexo
5 de formas que não estão em complexo ou ambas as proteínas, bem como acomodar a automatização do ensaio. A ligação de um composto de teste às fímbrias gram-positivas ou a uma proteína de fímbria gram-positiva, ou a interação de fímbrias gram-positivas ou de uma proteína de fímbria gram-positiva com uma molécula-alvo na presença ou ausência de
10 um composto candidato, pode ser obtida em qualquer vaso adequado para conter os reagentes. Exemplos desses vasos incluem placas de microlitro, tubos de ensaio e tubos da microcentrífuga. Em uma modalidade, pode ser fornecida uma
15 proteína de fusão que adiciona um domínio que permite que uma ou ambas as proteínas sejam ligadas a uma matriz. Por exemplo, proteínas de fusão de glutathione-S-transferase/proteína de fímbria ou proteínas de fusão glutathione-S-transferase/alvo podem ser adsorvidas sobre
20 glóbulos de glutathione Sefarose™ (Sigma Chemical, St. Louis, MO) ou placas de microlitro derivatizadas com glutathione, que são então combinadas com o composto de teste, ou o composto de teste e a proteína-alvo não adsorvida ou fímbrias gram-positivas ou uma proteína de
25 fímbrias gram-positivas, e a mistura incubada sob condições que conduzem à formação de complexos (por exemplo, em condições fisiológicas para sal e pH). Após incubação, os glóbulos ou os poços de uma placa de microtitulação são lavados para a remoção de componentes não ligados, da
30 matriz imobilizada, no caso de glóbulos, o complexo é

determinado direta ou indiretamente, por exemplo, como descrito acima. Alternativamente, os complexos podem ser dissociados da matriz, e o nível de ligação ou da atividade de fímbrias gram-positivas ou de uma proteína de fímbria gram-positiva é determinado com o uso de técnicas padronizadas.

Outras técnicas para a imobilização de fímbrias gram-positivas (por exemplo, de *S. pneumoniae*) ou de uma proteína de fímbrias gram-positivas ou de um alvo de ligação sobre matrizes incluem o uso da conjugação de biotina e estreptavidina. Fímbrias gram-positivas ou uma proteína de fímbria gram-positiva ou moléculas-alvo biotiniladas podem ser preparadas a partir de biotina-NHS (N-hidróxi-succinimida) com o uso de metodologias conhecidas na técnica (por exemplo, kits de biotinilação de Pierce Chemicals, Rockford, IL), e imobilizadas nos poços de placas de 96 poços revestidas com estreptavidina (Pierce Chemical).

Para a realização do ensaio, o componente não imobilizado é adicionado à superfície revestida que contém o componente ancorado. Após o término da reação, os componentes não reagidos são removidos (por exemplo, por lavagem) sob condições que façam com que quaisquer complexos formados permaneçam imobilizados na superfície sólida. A detecção de complexos ancorados na superfície sólida pode ser efetuada por várias formas. Quando o componente previamente não imobilizado é pré-marcado, a detecção do marcador imobilizado na superfície indica que foram formados complexos. Quando o componente previamente não imobilizado não é pré-marcado, pode ser usado um

marcador indireto para a detecção de complexos ancorados na superfície; por exemplo, o uso de um anticorpo específico marcado para o componente imobilizado (o anticorpo, por sua vez, pode ser marcado diretamente ou marcado indiretamente com, por exemplo, um anticorpo anti-Ig marcado).

Em algumas modalidades, esse ensaio é realizado com a utilização de anticorpos que se ligam especificamente às fímbrias gram-positivas (por exemplo, de *S. pneumoniae*) ou a uma proteína de uma fímbria gram-positiva (por exemplo, de *S. pneumoniae*) ou alvos de ligação, mas não interferem com a ligação das fímbrias gram-positivas ou da proteína de fímbrias gram-positivas ao seu alvo. Esses anticorpos podem ser derivatizados para os poços da placa, e o alvo, ou fímbrias gram-positivas ou proteína de fímbrias gram-positivas, não ligado capturado nos poços por conjugação de anticorpo. Métodos para a detecção desses complexos, além daqueles descritos acima para os complexos imobilizados em GST, incluem a imunodetecção de complexos com o uso de anticorpos reativos com as fímbrias gram-positivas ou com uma proteína de fímbria gram-positiva ou molécula-alvo, bem como ensaios ligados à enzima que se baseiam na detecção de uma atividade enzimática associada às fímbrias gram-positivas ou a uma proteína de fímbria gram-positiva ou molécula-alvo.

Em algumas modalidades, ensaios sem células podem ser realizados em uma fase líquida. Em um ensaio desse tipo, os produtos de reação são separados de componentes não reagidos, por qualquer uma entre diversas técnicas padronizadas, incluindo, sem limitação: centrifugação diferencial (por exemplo, Rivas e cols., 1993, Trends

Biochem. Sci., 18: 284-287); cromatografia (cromatografia por filtração em gel, cromatografia por troca iônica); eletroforese (por exemplo, Ausubel e cols., eds., 1999, "Current Protocols in Molecular Biology", J. Wiley: Nova York.); e imunoprecipitação (por exemplo, Ausubel e cols., eds., 1999, "Current Protocols in Molecular Biology", J. Wiley: Nova York). Essas resinas e técnicas cromatográficas são conhecidas por aqueles habilitados na técnica (por exemplo, Heegaard, 1998, *J. Mol. Recognit.*, 11: 141-148 e Hage e cols., 1997, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, 699: 499-525). Além disso, a transferência de energia de fluorescência também pode ser convenientemente utilizada, como aqui descrito, para detectar a ligação, sem purificação adicional do complexo da solução.

Em algumas modalidades, o ensaio inclui o contato das fímbrias gram-positivas (por exemplo, de *S. pneumoniae*) ou de uma proteína de uma fímbria gram-positiva (por exemplo, de *S. pneumoniae*) ou uma porção biologicamente ativa desta, com uma célula ou um composto conhecido (por exemplo, uma proteína) que se liga às fímbrias gram-positivas ou com uma proteína de uma fímbria gram-positiva para formar uma mistura de ensaio, o contato da mistura de ensaio com um composto de teste e a determinação da habilidade do composto de teste para afetar a ligação das fímbrias gram-positivas ou uma de proteína de fímbria gram-positiva à célula ou ao composto.

Em algumas modalidades, um ensaio para ligação das células bacterianas que expressam fímbrias de *S. pneumoniae* envolve a incubação de células bacterianas que expressam fímbrias de *S. pneumoniae* com células epiteliais pulmonares

A549, lavagem para a remoção de células bacterianas não aderentes, e a detecção das células bacterianas aderentes. A aderência bacteriana pode ser medida por qualquer meio conhecido na técnica, por exemplo, detecção da ligação de um anticorpo às células bacterianas aderentes ou lise das células epiteliais e contagem do número de células bacterianas associadas. Células HEP2, células CHO ou células HeLa também podem ser usadas em ensaios de ligação de células bacterianas que expressam fímbrias de *S. pneumoniae*.

Composições imunogênicas

As composições imunogênicas da invenção que incluem fímbrias gram-positivas (por exemplo, de *S. pneumoniae*) podem ainda compreender um ou mais agentes antigênicos. Antígenos exemplares incluem aqueles listados abaixo. Adicionalmente, as composições da presente invenção podem ser usadas para tratar ou evitar infecções causadas por qualquer um dos micróbios listados abaixo ou micróbios relacionados. Antígenos para uso nas composições imunogênicas incluem, sem limitação, um ou mais dos seguintes apresentados abaixo, ou antígenos derivados de um ou mais dos seguintes apresentados abaixo:

Antígenos bacterianos

N. meningitidis: um antígeno protéico de *N. meningitidis* sorogrupo A, C, W135 Y e/ou B (1-7); uma preparação de vesícula da membrana externa (OMV) de *N. meningitidis* sorogrupo B. (8, 9, 10, 11); um antígeno sacarídico, incluindo LPS, de *N. meningitidis* sorogrupo A, B, C W135 e/ou Y como, por exemplo, o oligossacarídeo do sorogrupo C (veja PCT/US99/09346; PCT IB98/01665; e PCT

11399/00103);

Streptococcus pneumoniae: um antígeno sacarídico ou protéico, particularmente um sacarídeo de *Streptococcus pneumoniae* ou uma proteína ou peptídeo antigênico de PhtD (BVH-11-2, SP1003, spr0907) (Adamou e cols., *Infect. Immun.*, 69: 949-53, 2001; Hamel e cols., *Infect. Immun.*, 72: 2.659-70, 2004); PhtE (BVH-3, SP1004, spr0908) (Adamou e cols., *Infect. Immun.*, 69: 949-53, 2001; Hamel e cols., *Infect. Immun.*, 72: 2.659-70, 2004); PhtB (PhtA, BVH-11, SP1174, spr1060) (Adamou e cols., *Infect. Immun.*, 69: 949-53, 2001; Zhang e cols., *Infect. Immun.*, 69: 3.827-36, 2001; Hamel e cols., *Infect. Immun.*, 72: 2.659-70, 2004); PhtA (BVH-11-3, SP1175, spr1061) (Adamou e cols., *Infect. Immun.*, 69: 949-53, 2001; Wizemann e cols., *Infect. Immun.*, 69: 1.593-98, 2001; Zhang e cols., *Infect. Immun.*, 69: 3.827-36, 2001; Hamel e cols., *Infect. Immun.*, 72: 2.659-70, 2004); NanA (SP1693, spr1536) (Tong e cols., *Infect. Immun.*, 73: 7.775-78, 2005); SP1872 (spr1687) (Brown e cols., *Infect. Immun.*, 69: 6.702-06, 2001); PspC (CbpA, SP2190, spr1995) (Ogunniyi e cols., *Infect. Immun.*, 69: 5.997-6.003, 2001); PspA (SP0177, spr0121, spr1274) (Briles e cols., *Vaccine*, 19: S87-S95, 2001); SPO498 (spr0440); LytB (SP0965, spr0867) (Wizemann e cols., *Infect. Immun.*, 69: 1.593-98, 2001); AliB (SP1527, spr1382); PpmA (SP0981, spr0884) (Overweg e cols., *Infect. Immun.*, 68: 4.180-4.188, 2000); LytC (SP1573, spr1431) (Wizemann e cols., *Infect. Immun.*, 69: 1.593-98, 2001); PsaA (Briles e cols., *Vaccine*, 19: S87-S95, 2001); PdB (Ogunniyi e cols., *Infect. Immun.*, 69: 5.997-6.003, 2001); RPhp (Zhang e cols., *Infect. Immun.*, 69: 3.827-36, 2001); PiuA (Jomaa e cols., *Vaccine*,

24: 5.133-39, 2006); PiaA (Jomaa e cols., Vaccine, 24: 5.133-39, 2006); 6PGD (Daniely e cols., Clin. Exp. Immunol., 144: 254-263, 2006); ou PppA (Green e cols., Infect. Immun., 73: 981-89, 2005);

5 *Streptococcus agalactiae*: particularmente, antígenos estreptocócicos do Grupo B;

Streptococcus pyogenes: particularmente, antígenos estreptocócicos do Grupo A;

Enterococcus faecalis ou *Enterococcus faecium*:
10 particularmente uma repetição de trissacarídeo ou outros antígenos derivados de *Enterococcus* fornecidos na Patente U.S. N° 6.756.361;

Helicobacter pylori: incluindo antígeno Cag, Vac, Nap, HopX, HopY e/ou urease;

15 *Bordetella pertussis*: por exemplo, holotoxina de pertussis (PT) e hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente também combinação com pertactina e/ou antígeno de aglutinógenos 2 e 3;

Staphylococcus aureus: incluindo polissacarídeos
20 capsulares de *S. aureus* do tipo 5 e 8, opcionalmente conjugados à exotoxina A atóxica recombinante de *Pseudomonas aeruginosa*, por exemplo, StaphVAX™, ou antígenos derivados de proteínas de superfície, invasinas (leucocidina, quinases, hialuronidase), fatores de
25 superfície que inibem o engolfamento fagocítico (cápsula, Proteína A), carotenóides, produção de catalase, Proteína A, coagulase, fator de coagulação e/ou toxinas que danificam a membrana (opcionalmente detoxificadas) que lisam membranas celulares eucarióticas (hemolisinas,
30 leucotoxina, leucocidina);

Staphylococcus epidermis: particularmente, antígeno de *S. epidermidis* associado ao biofilme *slime* (SAA);

Staphylococcus saprophyticus: (que causam infecções do trato urinário), particularmente a hemaglutinina de 160 kDa
5 do antígeno de *S. saprophyticus*;

Pseudomonas aeruginosa: particularmente, endotoxina A, proteína Wzz, LPS de *P. aeruginosa*, mais particularmente LPS isolado de PAO1 (sorotipo O5) e/ou proteínas da membrana externa, incluindo proteínas da membrana externa F
10 (OprF) (*Infect. Immun.* maio de 2001; 69(5): 3.510-3.515);

Bacillus anthracis (antraz): por exemplo, antígenos de *B. anthracis* (opcionalmente detoxificados) de componentes A (fator letal (LF) e fator de edema (EF)), ambos podendo compartilhar um componente B comum conhecido como antígeno
15 protetor (PA);

Moraxella catarrhalis: (respiratória) incluindo antígenos da proteína da membrana externa (HMW-OMP), antígeno C e/ou LPS;

Yersinia pestis (praga): por exemplo, antígeno capsular F1 (*Infect. Immun.* janeiro de 2003; 71(1)): 374-383, LPS (*Infect. Immun.* outubro de 1999; 67(10): 5395), antígeno V de *Yersinia pestis* (*Infect. Immun.* novembro de 1997; 65(11): 4.476-4.482);

Yersinia enterocolitica (patógeno gastrointestinal):
25 particularmente LPS (*Infect. Immun.* agosto de 2002; 70(8): 4.414);

Yersinia pseudotuberculosis: antígenos de patógeno gastrointestinal;

Mycobacterium tuberculosis: por exemplo,
30 lipoproteínas, LPS, antígenos de BCG, uma proteína de fusão

de antígeno 85B (Ag85B) e/ou ESAT-6, formulados
 opcionalmente em vesículas lipídicas catiônicas (*Infect.*
Immun. outubro de 2004; 72(10): 6148), antígenos associados
 à isocitrato desidrogenase de *Mycobacterium tuberculosis*
 5 (Mtb) (*Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 24 de agosto de 2004; 101
 (34): 12.652) e/ou antígenos MPT51 (*Infect. Immun.* julho de
 2004; 72(7): 3829);

Legionella pneumophila (doença dos legionários):
 antígenos de *L. pneumophila* opcionalmente derivados de
 10 linhagens celulares com genes *asd* rompidos (*Infect. Immun.*
 maio de 1998; 66(5): 1898);

Rickettsia: incluindo proteínas da membrana externa,
 incluindo a proteína da membrana externa A e/ou B (OmpB)
 (*Biochim. Biophys Acta.* 1º de novembro de 2004; 1.702(2):
 15 145), LPS e antígeno de proteína de superfície (SPA) (*J.*
Autoimmun. junho de 1989; 2 Supl.:81);

E. coli: incluindo antígenos de *E. coli*
 enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAggEC),
E. coli difusamente aderente (DAEC), *E. coli*
 20 enteropatogênica (EPEC) e/ou *E. coli* enterohemorrágica
 (EHEC);

Vibrio cholerae: incluindo antígenos de proteinase,
 LPS, particularmente lipopolissacarídeos de *Vibrio cholerae*
 II, polissacarídeos O1 Inaba O-específicos, *V. cholera*
 25 O139, antígenos de vacina IEM108 (*Infect. Immun.* outubro de
 2003; 71(10): 5.498-504) e/ou toxina da *Zonula occludens*
 (Zot);

Salmonella typhi (febre tifóide): incluindo
 polissacarídeos capsulares preferivelmente conjugados (Vi,
 30 ou seja, vax-TyVi);

Salmonella typhimurium (gastroenterite): antígenos derivados deste são contemplados para terapias microbianas e de câncer, incluindo inibição da angiogênese e modulação de flk;

5 *Listeria monocytogenes* (infecções sistêmicas em pessoas imunocomprometidas ou idosas, infecções do feto): antígenos derivados de *L. monocytogenes* são usados preferivelmente como veículos/vetores para liberação intracitoplasmática de conjugados/composições associadas da
10 presente invenção;

Porphyromonas gingivalis: particularmente, proteína da membrana externa (OMP) de *P. gingivalis*;

Tétano: por exemplo, antígenos de toxóide tetânico (TT), usados preferivelmente como uma proteína
15 transportadora em conjunto/conjugada com as composições da presente invenção;

Difteria: por exemplo, um toxóide diftérico (por exemplo, CRM₁₉₇), adicionalmente antígenos capazes de modular, inibir ou se associar à ribosilação de ADP são
20 contemplados para combinação/co-administração/conjugação com as composições da presente invenção; os toxóides diftéricos podem ser usados como proteínas transportadoras;

Borrelia burgdorferi (doença de Lyme): por exemplo, antígenos associados à P39 e P13 (uma proteína integral da
25 membrana, *Infect. Immun.* maio de 2001; 69(5): 3.323-3.334), proteína de variação antigênica VlsE (*J. Clin. Microbiol.* dezembro de 1999; 37(12): 3.997);

Haemophilus influenzae B: por exemplo, um antígeno sacarídico deste;

30 *Klebsiella*: por exemplo, uma OMP, incluindo OMP A ou

um polissacarídeo opcionalmente conjugado ao toxóide tetânico;

Neisseria gonorrhoeae: incluindo uma proteína Por (ou porina), por exemplo, PorB (veja Zhu e cols., *Vaccine* 5 (2004) 22:660-669), uma proteína de ligação de transferrina, por exemplo, TbpA e TbpB (veja Price e cols., *Infection and Immunity* (2004) 71 (1): 277-283), uma proteína de opacidade (por exemplo, Opa), uma proteína modificável por redução (Rmp) e preparações de vesícula da 10 membrana externa (OMV) (veja Plante e cols., *J. Infectious Disease* (2000) 182:848-855); veja também, por exemplo, WO 99/24578, WO 99/36544, WO 99/57280, WO 02/079243;

Chlamydia pneumoniae: particularmente antígenos protéicos de *C. pneumoniae*;

15 *Chlamydia trachomatis*: incluindo antígenos derivados de sorotipos A, B, Ba e C (são agentes do tracoma, uma causa de cegueira), sorotipos L1, L2 e L3 (associados ao linfogranuloma venéreo) e sorotipos, D-K;

Treponema pallidum (sífilis): particularmente um 20 antígeno TmpA; e

Haemophilus ducreyi (que causa o cancroíde): incluindo proteína da membrana externa (DsrA).

Quando não citados especificamente, antígenos bacterianos da invenção adicionais podem ser antígenos 25 capsulares, antígenos polissacarídicos ou antígenos protéicos de qualquer um dos citados acima. Antígenos bacterianos adicionais também podem incluir uma preparação de vesícula da membrana externa (OMV). Adicionalmente, antígenos incluem versões vivas, atenuadas e/ou purificadas 30 de qualquer uma das bactérias mencionadas anteriormente. Os

antígenos derivados de bactérias ou micróbios da presente invenção podem ser gram-negativos ou gram-positivos e aeróbicos ou anaeróbicos.

Adicionalmente, qualquer um dos sacarídeos derivados de bactérias acima (polissacarídeos, LPS, LOS ou oligossacarídeos) pode ser conjugado a outro agente ou antígeno, por exemplo, uma proteína transportadora (por exemplo, CRM₁₉₇). Essa conjugação pode ser uma conjugação direta efetuada por aminação redutiva de porções carbonil no sacarídeo em grupos amino na proteína, como fornecido na Patente U.S. Nº 5.360.897 em *Can. J. Biochem. Cell Biol.* maio de 1984; 62(5): 270-5. Alternativamente, os sacarídeos podem ser conjugados por meio de um vinculador, por exemplo, com succinimida ou outras ligações fornecidas em "Bioconjugate Techniques", 1996 e "CRC, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking", 1993.

Antígenos virais

Influenza: incluindo partículas virais inteiras (atenuadas), divididas ou subunidades que compreendem proteínas de superfície hemaglutinina (HA) e/ou neuraminidase (NA); os antígenos de influenza podem ser derivados de embriões de galinha ou propagados em cultura de células e/ou os antígenos de influenza são derivados de influenza tipo A, B e/ou C, entre outros;

Vírus respiratório sincicial (RSV): incluindo a proteína F da cepa A2 de RSV (*J. Gen. Virol.* novembro de 2004; 85 (Pt 11):3229) e/ou glicoproteína G;

Vírus Parainfluenza (PIV): incluindo PIV do tipo 1, 2, e 3, preferivelmente contendo glicoproteínas hemaglutinina, neuraminidase e/ou de fusão;

Poliovírus: incluindo antígenos de uma família de picornaviridae, preferivelmente antígenos de poliovírus como, por exemplo, OPV ou, preferivelmente IPV;

Sarampo: incluindo antígeno do vírus dividido do sarampo (MV), opcionalmente combinado com *Protollin* e/ou antígenos presentes na vacina MMR;

Caxumba: incluindo antígenos presentes na vacina MMR;

Rubéola: incluindo antígenos presentes na vacina MMR, além de outros antígenos de Togaviridae, incluindo o vírus da dengue;

Raiva: por exemplo, o vírus inativado liofilizado (RabAvert™);

Vírus Flaviviridae: por exemplo, o vírus da febre amarela (e antígenos derivados deste), vírus da encefalite japonesa, vírus da dengue (tipos 1, 2, 3 ou 4), vírus da encefalite transmitida por carrapato e vírus do Nilo ocidental;

Caliciviridae: antígenos destes;

HIV: incluindo antígenos da cepa HIV-1 ou HIV-2, por exemplo, gag (p24gag e p55gag), env (gp160 e gp41), pol, tat, nef, rev vpu, miniproteínas, (preferivelmente p55 gag e gp140v delete) e antígenos dos isolados H_{IIb}, HIV_{SF2}, HIV_{LAV}, HIV_{LAI}, HIV_{MN}, HIV-1_{CM235}, HIV-1_{US4}, HIV-2; vírus da imunodeficiência dos símios (SIV), dentre outros;

Rotavírus: incluindo proteínas VP4, VP5, VP6, VP7, VP8 (*Protein Expr Purif.* dezembro de 2004; 38(2): 205) e/ou NSP4;

Pestivírus: por exemplo, antígenos do vírus da febre suína clássica, vírus da diarréia bovina viral e/ou vírus da doença da fronteira;

Parvovírus: por exemplo, parvovírus B19;

Coronavírus: incluindo antígenos do vírus da SARS, particularmente proteína ou proteases *spike* destes, além de antígenos incluídos em WO 04/92360;

5 *Vírus da hepatite A*: por exemplo, vírus inativado;

Vírus da hepatite B: por exemplo, os antígenos de superfície e/ou centrais (sAg), além das seqüências pré-superfície, pré-S1 e pré-S2 (anteriormente denominadas pré-S), bem como combinações dos acima citados, por exemplo,
10 sAg/pré-S1, sAg/pré-S2, sAg/pré-S1/pré-S2 e pré-S1/pré-S2, (veja, por exemplo, "AHBV Vaccines - Human Vaccines and Vaccination", pp. 159-176; e Patentes U.S. Nºs 4.722.840, 5.098.704, 5.324.513; Beames e cols., *J. Virol.* (1995) 69: 6.833-6.838, Birnbaum e cols., *J Virol.* (1990) 64: 3.319-
15 3.330; e Zhou e cols., *Virol.* (1991) 65: 5.457-5.464);

Vírus da hepatite C: por exemplo, E1, E2, E1/E2 (veja, Houghton e cols., *Hepatology* (1991) 14: 381), poliproteína NS345, poliproteína central NS 345, núcleo e/ou peptídeos das regiões não estruturais (Publicações Internacionais Nºs
20 WO 89/04669, WO 90/11089 e WO 90/14436);

Vírus da hepatite Delta (HDV): antígenos derivados deste, particularmente antígeno 6 de HDV (veja, por exemplo, Patente U.S. Nº 5.378.814);

Vírus da hepatite E (HEV): antígenos derivados deste;

25 *Vírus da hepatite G (HGV)*: antígenos derivados deste;

Vírus da varicella zoster: antígenos derivados do vírus varicela zoster (VZV) (*J. Gen. Virol.* (1986) 67: 1.759);

Vírus de Epstein-Barr: antígenos derivados do EBV
30 (Baer e cols., *Nature* (1984) 310: 207);

Citomegalovírus: antígenos do CMV, incluindo gB e gH ("Cytomegaloviruses" (J.K. McDougall, ed., Springer-Verlag 1990) pp. 125-169);

Vírus do herpes simples: incluindo antígenos de cepas HSV-1 ou HSV-2 e glicoproteínas gB, gD e gH (McGeoch e cols., *J. Gen. Virol.* (1988) 69: 1.531 e Patente U.S. N° 5.171.568);

Vírus do herpes humano: antígenos derivados de outros herpesvírus humanos, tais com o HHV6 e HHV7; e

10 *HPV*: incluindo antígenos associados ou derivados do papilomavírus humano (HPV), por exemplo, um ou mais de E1 – E7, L1, L2, e fusões destes, particularmente as composições da invenção podem incluir uma partícula semelhante a vírus (Vírus-like) (VLP) que compreende a proteína principal do capsídeo L1, mais particularmente ainda, os antígenos do HPV são protetores contra um ou mais dos sorotipos do HPV 6, 11, 16 e/ou 18.

São ainda fornecidos antígenos, composições, métodos, e micróbios incluídos em "Vaccines", 4ª Edição (Plotkin e 20 Orenstein ed. 2004); "Medical Microbiology" 4ª Edição (Murray e cols. ed. 2002); "Virology", 3ª Edição (W.K. Joklik ed. 1988); "Fundamental Virology", 2ª Edição (B.N. Fields e D.M. Knipe, eds. 1991), que são contemplados em conjunto com as composições da presente invenção.

25 Adicionalmente, antígenos incluem versões vivas, atenuadas, divididas e/ou purificadas de qualquer um dos vírus mencionados anteriormente.

Antígenos fúngicos

Antígenos fúngicos para uso na invenção, associados a 30 vacinas, incluem aqueles descritos: nas Patentes U.S. N°s

4.229.434 e 4.368.191 para profilaxia e tratamento de tricofitose causada por *Trichophyton mentagrophytes*; Patentes U.S. N^{os} 5.277.904 e 5.284.652 para uma vacina para dermatófito de amplo espectro para a profilaxia de
 5 infecção por dermatófitos em animais, por exemplo, porquinhos-da-índia, gatos, coelhos, cavalos e cordeiros, esses antígenos compreendendo uma suspensão de *T. equinum*, *T. mentagrophytes* (var. *granulare*), *M. canis* e/ou *M. gypseum* mortos em uma quantidade eficaz, opcionalmente
 10 combinados com um adjuvante; Patentes U.S. N^{os} 5.453.273 e 6.132.733 para uma vacina para tinea que compreende uma quantidade eficaz de fungos homogeneizados, mortos por formaldeído, ou seja, cultura de *Microsporum canis* em um veículo; Patente U.S. N^o 5.948.413, que envolve proteínas
 15 extracelulares e intracelulares para pitiose. Antígenos adicionais identificados dentro das vacinas antifúngicas incluem *Ringvac bovis* LTF-130 e Bioveta.

Além disso, antígenos fúngicos para uso na invenção podem ser derivados de *Dermatophytes*, incluindo:
 20 *Epidermophyton floccusum*, *Microsporum audouini*, *Microsporum canis*, *Microsporum distortum*, *Microsporum equinum*, *Microsporum gypsum*, *Microsporum nanum*, *Trichophyton concentricum*, *Trichophyton equinum*, *Trichophyton gallinae*, *Trichophyton gypseum*, *Trichophyton megnini*, *Trichophyton*
 25 *mentagrophytes*, *Trichophyton quinckeanum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton schoenleini*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton verrucosum*, *T. verrucosum* var. *album*, var. *discoides*, var. *ochraceum*, *Trichophyton violaceum* e/ou *Trichophyton faviforme*.

30 Patógenos fúngicos para uso como antígenos ou na

derivação de antígenos em conjunto com as composições da
 presente invenção compreendem *Aspergillus fumigatus*,
Aspergillus flavus, *Aspergillus niger*, *Aspergillus*
nidulans, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus sydowi*,
 5 *Aspergillus flavatus*, *Aspergillus glaucus*,
Blastoschizomyces capitatus, *Candida albicans*, *Candida*
enolase, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida*
krusei, *Candida parapsilosis*, *Candida stellatoidea*, *Candida*
kusei, *Candida parakwsei*, *Candida lusitaniae*, *Candida*
 10 *pseudotropicalis*, *Candida guilliermondi*, *Cladosporium*
carrionii, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatidis*,
Cryptococcus neoformans, *Geotrichum clavatum*, *Histoplasma*
capsulatum, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Pneumocystis*
carinii, *Pythium insidiosum*, *Pityrosporum ovale*,
 15 *Sacharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*,
Saccharomyces pombe, *Scedosporium apiospermum*, *Sporothrix*
schenckii, *Trichosporon beigelii*, *Toxoplasma gondii*,
Penicillium marneffeii, *Malassezia* spp., *Fonsecaea* spp.,
Wangiella spp., *Sporothrix* spp., *Basidiobolus* spp.,
 20 *Conidiobolus* spp., *Rhizopus* spp, *Mucor* spp, *Absidia* spp,
Mortierella spp, *Cunninghamella* spp e *Saksenaea* spp.

Outros fungos dos quais antígenos podem ser derivados
 incluem *Alternaria* spp, *Curvularia* spp, *Helminthosporium*
 spp, *Fusarium* spp, *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp,
 25 *Monolinia* spp, *Rhizoctonia* spp, *Paecilomyces* spp,
Pithomyces spp e *Cladosporium* spp.

Processos para a produção de antígenos fúngicos são
 bem conhecidos na técnica (veja Patente U.S. N° 6.333.164).
 Em algumas modalidades, uma fração solubilizada é extraída
 30 e separada de uma fração insolúvel que pode ser obtida de

células fúngicas das quais a parede celular foi substancialmente removida ou pelo menos parcialmente removida, caracterizada pelo fato de que o processo compreende a obtenção de células fúngicas vivas; a obtenção
5 de células fúngicas das quais a parede celular foi substancialmente removida ou pelo menos parcialmente removida; o rompimento das células fúngicas das quais a parede celular foi substancialmente removida ou pelo menos parcialmente removida; a obtenção de uma fração insolúvel;
10 e a extração e separação de uma fração solubilizada da fração insolúvel.

Antígenos STD

Em algumas modalidades, micróbios (bactérias, vírus e/ou fungos) contra os quais as presentes composições e
15 métodos podem ser implementados incluem aqueles que causam doenças sexualmente transmitidas (DSTs) e/ou aqueles que apresentam em sua superfície um antígeno que possa ser o alvo ou a composição de antígeno da invenção. Em algumas modalidades da invenção, as composições são combinadas com
20 antígenos derivados de um STD viral ou bacteriano. Antígenos derivados de bactérias ou vírus podem ser administrados em conjunto com as composições da presente invenção para fornecer proteção contra pelo menos uma das seguintes DSTs, dentre outras: clamídia, herpes genital,
25 hepatite (particularmente HCV), condiloma acuminatum, gonorréia, sífilis e/ou cancróide (veja, por exemplo, WO 00/15255).

Em algumas modalidades, as composições da presente invenção são co-administradas com um antígeno para a
30 prevenção ou o tratamento de uma DST.

Antígenos derivados dos seguintes vírus associados às DSTs, que foram descritos com mais detalhes acima, são co-administrados com as composições da presente invenção: hepatite (particularmente HCV), HPV, HIV ou HSV.

5 Adicionalmente, antígenos derivados das seguintes bactérias associadas às DSTs, que foram descritas com mais detalhes acima, são co-administrados com as composições da presente invenção: *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum* ou
10 *Haemophilus ducreyi*.

Antígenos respiratórios

Em algumas modalidades, o antígeno de fímbria gram-positiva (por exemplo, de *S. pneumoniae*) é um antígeno respiratório, e é usado em uma composição imunogênica para
15 métodos de prevenção e/ou tratamento de infecção por um patógeno respiratório, incluindo um vírus, bactérias ou fungos como, por exemplo, o vírus sincicial respiratório (RSV), PTV, vírus da SARS, influenza, *Bacillus anthracis*, particularmente por redução ou prevenção de infecção e/ou
20 um ou mais sintomas de infecção por um vírus respiratório. Uma composição que compreende um antígeno aqui descrito, por exemplo, um derivado de um vírus, uma bactéria ou um fungo respiratório, é administrada em conjunto com as composições da presente invenção a um indivíduo em risco de
25 ser exposto àquele micróbio respiratório em particular, que foi exposto a um micróbio respiratório ou que está infectado com um vírus, uma bactéria ou um fungo respiratório. As composições da presente invenção podem ser co-administradas ao mesmo tempo ou na mesma formulação com
30 um antígeno do patógeno respiratório. A administração da

composição resulta em uma incidência e/ou gravidade reduzida de um ou mais sintomas de uma infecção respiratória.

Antígenos pediátricos/geriátricos

5 Em algumas modalidades, as composições da presente invenção são usadas em conjunto com um ou mais antígenos para o tratamento de uma população pediátrica, como em um antígeno pediátrico. Em algumas modalidades, a idade dos indivíduos na população pediátrica é de menos de cerca de 3
10 anos de idade, ou menos de cerca de 2 anos, ou menos de cerca de 1 ano de idade. Em algumas modalidades, o antígeno pediátrico (em conjunto com a composição da presente invenção) é administrado várias vezes ao longo de pelo menos 1, 2 ou 3 anos.

15 Em algumas modalidades, as composições da presente invenção são usadas em conjunto com um ou mais antígenos para o tratamento de uma população geriátrica, como em um antígeno geriátrico. Em algumas modalidades, a idade dos indivíduos na população geriátrica é maior do que 50, 55,
20 60, 65, 70 ou 75 anos de idade.

Outros antígenos

Outros antígenos para uso em conjunto com as composições da presente invenção incluem antígenos associados a infecções hospitalares (nosocomiais).

25 Em algumas modalidades, antígenos parasíticos são contemplados em conjunto com as composições da presente invenção. Exemplos de antígenos parasíticos incluem aqueles derivados de organismos que causam doenças, incluindo, sem limitação, malária e/ou doença de Lyme.

30 Em algumas modalidades, os antígenos, em conjunto com

as composições da presente invenção, estão associados e/ou são eficazes contra uma doença transmitida por um mosquito. Em algumas modalidades, os antígenos em conjunto com as composições da presente invenção estão associados com e/ou
5 são eficazes contra encefalite. Em algumas modalidades, os antígenos, em conjunto com as composições da presente invenção, estão associados e/ou são eficazes contra uma infecção do sistema nervoso.

Em algumas modalidades, os antígenos, em conjunto com
10 as composições da presente invenção, são antígenos transmissíveis por meio do sangue ou de líquidos corporais.

Formulações de antígeno

Em alguns aspectos da invenção, são fornecidos métodos de produção de micropartículas que possuem antígenos
15 adsorvidos. Os métodos compreendem: (a) o fornecimento de uma emulsão por dispersão de uma mistura que compreende: (i) água, (ii) um detergente, (iii) um solvente orgânico, e (iv) um polímero biodegradável selecionado do grupo que consiste em um poli(α -hidróxi ácido), um ácido poli-hidróxi
20 butírico, uma policaprolactona, um poliortoéster, um polianidrido e um policianoacrilato. O polímero está tipicamente presente na mistura em uma concentração de cerca de 1% a cerca de 30% em relação ao solvente orgânico, enquanto o detergente está tipicamente presente na mistura
25 em uma proporção peso-por-peso detergente-para-polímero de cerca de 0,00001:1 a cerca de 0,1:1 (mais tipicamente, cerca de 0,0001:1 a cerca de 0,1:1, cerca de 0,001:1 a cerca de 0,1:1, ou cerca de 0,005:1 a cerca de 0,1:1); (b) a remoção do solvente orgânico da emulsão; e (c) a adsorção
30 de um antígeno na superfície das micropartículas. Em

algumas modalidades, o polímero biodegradável está presente em uma concentração de cerca de 3% a cerca de 10% em relação ao solvente orgânico.

Em algumas modalidades, as micropartículas para uso na
5 invenção podem ser formadas por materiais que são esterilizáveis, atóxicos e biodegradáveis. Tais materiais incluem, sem limitação, poli(α -hidróxi ácido), ácido poli-hidróxi butírico, policaprolactona, poliortoéster, polianidrido, PACA e policianoacrilato. Em algumas
10 modalidades, as micropartículas para uso com a presente invenção são derivadas de um poli(α -hidróxi ácido), em particular, de uma poli(lactida) ("PLA") ou um copolímero de D,L-lactida e glicolida ou ácido glicólico, por exemplo, uma poli(D,L-lactida-co-glicolida) ("PLO" ou "PLGA"), ou um
15 copolímero de D,L-lactida e caprolactona. As micropartículas podem ser derivadas de qualquer um dentre vários materiais poliméricos de partida que possuem uma variedade de pesos moleculares e, no caso dos copolímeros como PLG, diversas proporções de lactida:glicolida, cuja
20 seleção será, em grande parte, uma questão de escolha, dependendo, em parte, da macromolécula co-administrada. Esses parâmetros serão discutidos com mais detalhe abaixo.

Antígenos adicionais também podem incluir uma preparação de vesícula da membrana externa (OMV).

25 Os antígenos também podem ser adsorvidos a peptidoglicanos de várias bactérias gram-positivas para a produção de partículas gram-positivas intensificadoras da matriz (GEM), como descrito em Bosnia e cols., *Appl. Env. Microbiol.*, 72: 880-889, 2006, cujo conteúdo total é aqui
30 incorporado por referência. Esse método se baseia na

ligação não covalente do padrão LysM (Buist e cols., *J. Bact.*, 177: 1.554-63, 1995; Bateman e Bycroft, *J. Mol. Biol.*, 299: 1.113-19, 2000) para o peptidoglicano da parede celular de células tratadas com ácido. Resumidamente, um
5 antígeno polipeptídico ligado a um ou mais padrões LysM (por exemplo, não covalentemente ou covalentemente (por exemplo, como uma proteína de fusão ou por conjugação)) é adicionado às bactérias gram-positivas tratadas com ácido. Os peptídeos do antígeno se ligam com alta afinidade, e
10 podem ser usados em composições imunogênicas. Ácidos exemplares usados nesses métodos incluem ácido tricloroacético (por exemplo, a 0,1%-10%), acético ácido (por exemplo, a 5,6 M), HCl (por exemplo, a 0,01 M), ácido láctico (por exemplo, a 0,72 M) e ácido fórmico (por
15 exemplo, a 0,56 M).

Métodos de formulação e antígenos adicionais (especialmente antígenos tumorais) são fornecidos na Patente U.S. N° de Série 09/581.772.

Referências de antígenos

20 As seguintes referências, cada uma das quais é especificamente incorporada por referência em sua totalidade, incluem antígenos úteis em conjunto com as composições da presente invenção:

- Pedido de patente internacional WO 99/24578.
- 25 Pedido de patente internacional WO 99/36544.
- Pedido de patente internacional WO 99/57280.
- Pedido de patente internacional WO 00/22430.
- Tettelin e cols. (2000) *Science* 287: 1.809-1.815.
- Pedido de patente internacional WO 96/29412.
- 30 Pizza e cols. (2000) *Science* 287: 1.816-1.820.

PCT WO 01/52885.

Bjune e cols. (1991) *Lancet* 338 (8.775).

Fuskasawa e cols. (1999) *Vaccine* 17: 2.951-2.958.

Rosenqist e cols. (1998) *Dev. Biol. Strand* 92: 323-

5 333.

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

Costantino e cols. (1999) *Vaccine* 17: 1.251-1.263.

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

Rubin (20000) *Pediatr. Clin. North Am.* 47: 269-285, v.

10 Jedrzejjas (2001) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65: 187-
207.

Pedido de patente internacional depositado em 3 de
julho de 2001, que reivindica prioridade para GB 0016363.4;
WO 02/02606; PCT IB/01/00166.

15 Kalman e cols. (1999) *Nature Genetics* 21: 385-389.

Read e cols. (2000) *Nucleic Acids Res.* 28: 1.397-406.

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

Pedido de patente internacional WO 99/27105.

20 Pedido de patente internacional WO 00/27994.

Pedido de patente internacional WO 00/37494.

Pedido de patente internacional WO 99/28475.

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

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

25 Gerlich e cols. (1990) *Vaccine* 8 Supl.: S63-68 & 79-
80.

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

Gastofsson e cols. (1996) *N. Engl. J. Med.* 334-: 349-
355.

30 Rappuoli e cols. (1991) *TIBTECH* 9: 232-238.

"Vaccines" (1988) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.

Del Guidice e cols. (1998) *Molecular Aspects of Medicine* 19: 1-70.

5 Pedido de patente internacional WO 93/018150.

Pedido de patente internacional WO 99/53310.

Pedido de patente internacional WO 98/04702.

Ross e cols. (2001) *Vaccine* 19: 135-142.

Sutter e cols. (2000) *Pediatr. Clin. North Am.* 47:
10 287-308.

Zimmerman & Spann (1999) *Am. Fam. Physician* 59: 113-118, 125-126.

Dreensen (1997) *Vaccine* 15 Supl. S2-6.

MMWR Morb. Mortal. Wkly. rep. janeiro de 1998 16:
15 47(1): 12, 9.

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

Schuchat (1999) *Lancet* 353(9146):51-6.

Pedidos de patente G.B. 0026333.5, 0028727.6 e
0105640.7.

20 Dale (1999) *Infect. Disclin. North Am.* 13: 227-43,
viii.

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

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

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

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

Buttery & Moxon (2000) *J. R. Coll. Physicians Long* 34:
163-168.

Ahmad & Chapnick (1999) *Infect. Dis. Clin. North Am.*
30 13: 113-133, vii.

Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47: 663-567.

Patente européia 0 477 508.

Patente U.S. N° 5.306.492.

Pedido de patente internacional WO 98/42721.

5 "Conjugate Vaccines" (eds. Cruse e cols.) ISBN 3805549326, particularmente vol. 10: 48-114.

Hermanson (1996) "Bioconjugate Techniques" ISBN: 012323368 & 012342335X.

Pedido de patente européia 0372501.

10 Pedido de patente européia 0378881.

Pedido de patente européia 0427347.

Pedido de patente internacional WO 93/17712.

Pedido de patente internacional WO 98/58668.

Pedido de patente européia 0471177.

15 Pedido de patente internacional WO 00/56360.

Pedido de patente internacional WO 00/67161.

Proteínas de fusão

As proteínas gram-positivas (por exemplo, de *S. pneumoniae*) usadas na invenção podem estar presentes na
 20 composição como polipeptídeos separados individuais. Em algumas modalidades, pelo menos dois (ou seja, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 ou 18) dos antígenos são expressos como uma cadeia polipeptídica simples (um polipeptídeo "híbrido" ou de "fusão") que
 25 inclui uma subunidade da fímbria. Esses polipeptídeos de fusão oferecem duas vantagens principais: primeiro, um polipeptídeo que pode ser instável ou pouco expresso por si próprio pode ser auxiliado por adição de um parceiro de fusão adequado que supera o problema; em segundo lugar, a
 30 fabricação comercial é simplificada, na medida em que

apenas uma expressão e uma purificação precisam ser usadas a fim de produzir dois polipeptídeos que são, ambos, antigenicamente úteis.

O polipeptídeo de fusão pode compreender uma ou mais
5 seqüências polipeptídicas de fímbrias gram-positivas (por exemplo, de *S. pneumoniae*). Conseqüentemente, a invenção inclui um ou mais peptídeos de fusão que compreendem uma primeira seqüência de aminoácidos e uma segunda seqüência de aminoácidos, em que as referidas primeira e segunda
10 seqüências de aminoácidos são selecionadas de uma proteína de fímbria gram-positiva ou um fragmento desta. Em algumas modalidades, a primeira e a segunda seqüências de aminoácidos no polipeptídeo de fusão compreendem epitopos diferentes da mesma proteína.

15 Em algumas modalidades, a presente invenção fornece híbridos (ou fusões) que compreendem seqüências de aminoácidos de dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove ou dez antígenos. Em algumas modalidades, a invenção fornece híbridos que compreendem seqüências de aminoácidos
20 de dois, três, quatro ou cinco antígenos.

Diferentes polipeptídeos híbridos podem ser misturados em conjunto em uma única formulação. Dentro dessas combinações, seqüência de uma fímbria gram-positiva (por exemplo, de *S. pneumoniae*) pode estar presente em mais de
25 um polipeptídeo híbrido e/ou como um polipeptídeo não híbrido. Em algumas modalidades, um antígeno está presente como um híbrido ou como um não híbrido, mas não como ambos.

Polipeptídeos híbridos podem ser representados pela fórmula $\text{NH}_2\text{-A-}\{-\text{X-L-}\}_n\text{-BCOOH}$, em que: X é uma seqüência de
30 aminoácidos de uma proteína de uma fímbria gram-positiva

(por exemplo, de *S. pneumoniae*) ou um fragmento desta; L é uma seqüência de aminoácidos vinculadora opcional; A é uma seqüência de aminoácidos do terminal N opcional; B é uma seqüência de aminoácidos do terminal C opcional; e n é 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15.

Caso uma porção -X- possua uma seqüência peptídica líder em sua forma do tipo selvagem, essa pode ser incluída ou omitida na proteína híbrida. Em algumas modalidades, os peptídeos líderes são eliminados, exceto aquele da porção-X- localizado no terminal N da proteína híbrida, ou seja, o peptídeo líder de X_1 será retido, mas os peptídeos líderes de $X_2 \dots X_n$ serão omitidos. Isso equivale a eliminar todos os peptídeos líderes e com o uso do peptídeo líder de X_1 como porção -A-.

Para cada n casos de $\{-X-L-\}$, a seqüência de aminoácidos vinculadora -L- pode estar presente ou ausente. Por exemplo, quando $n = 2$, o híbrido pode ser $NH_2-X_1-L_1-X_2-L_2-COOH$, $NH_2-X_1-X_2-COOH$, $NH_2-X_1-L_1-X_2-COOH$, $NH_2-X_1-X_2-L_2-COOH$ etc. Seqüências de aminoácidos vinculadoras -L- tipicamente serão curtas (por exemplo, 20 aminoácidos ou menos, ou seja, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Exemplos compreendem seqüências peptídicas curtas que facilitam a clonagem, vinculadores de poliglicina (ou seja, que compreendem Gly_n , em que $n = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ ou mais), e tags de histidina (ou seja, His, em que $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ ou mais). Outras seqüências de aminoácidos vinculadoras adequadas ficarão evidentes para aqueles habilitados na técnica. Um vinculador útil é GSGGGG (ID. DE SEQ. N°: 53), com o dipeptídeo Gly-Ser sendo formado por um sítio de restrição

BamHI, ajudando, dessa forma, a clonagem e manipulação, e o tetrapeptídeo (Gly)₄ sendo um vinculador de poli-glicina típico.

Em algumas modalidades, -A- é uma seqüência de aminoácidos do terminal N opcional. Ela tipicamente será curta (por exemplo, 40 aminoácidos ou menos, ou seja, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Exemplos incluem seqüências líderes para dirigir o tráfego de proteína, ou seqüências peptídicas curtas que facilitam a clonagem ou purificação (por exemplo, tags de histidina, ou seja, His_n, em que n = 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais). Outras seqüências de aminoácidos do terminal N adequadas ficarão evidentes para aqueles habilitados na técnica. Caso X₁ não possua sua própria metionina do terminal N, em algumas modalidades -A- é um oligopeptídeo (por exemplo, com 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 aminoácidos) que fornece uma metionina do terminal N.

Em algumas modalidades, -B- é uma seqüência de aminoácidos do terminal C opcional. Essa tipicamente será curta (por exemplo, 40 aminoácidos ou menos, ou seja, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Exemplos incluem seqüências para dirigir o tráfego de proteínas, seqüências peptídicas curtas que facilitam a clonagem ou purificação (por exemplo, que compreendem tags de histidina, ou seja, His_n, em que n = 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais), ou seqüências que aumentam a estabilidade da proteína. Outras seqüências de aminoácidos do terminal C adequadas ficarão evidentes para

aqueles habilitados na técnica.

Em algumas modalidades, n é 2 ou 3.

Composições imunogênicas e medicamentos

Em algumas modalidades, as composições da invenção são
5 composições imunogênicas. Em algumas modalidades, as
composições são composições de vacina. Em algumas
modalidades, o pH da composição é entre 6 e 8 e, em algumas
modalidades, é de cerca de 7. O pH pode ser mantido pelo
uso de um tampão. A composição pode ser estéril e/ou isenta
10 de pirogênio. A composição pode ser isotônica com relação
aos seres humanos. Em algumas modalidades, a composição é
um injetável estéril.

Vacinas de acordo com a invenção podem ser
profiláticas (ou seja, para evitar a infecção) ou
15 terapêuticas (ou seja, para tratar a infecção).
Conseqüentemente, a invenção fornece métodos para o
tratamento terapêutico ou profilático de uma infecção
bacteriana gram-positiva (por exemplo, por *S. pneumoniae*)
em um animal suscetível a essa infecção bacteriana gram-
20 positiva (por exemplo, por *S. pneumoniae*) que compreende a
administração ao referido animal de uma quantidade
terapêutica ou profilática das composições da invenção. Por
exemplo, a invenção inclui métodos para o tratamento
terapêutico ou profilático de uma infecção por *S.*
25 *pneumoniae* em um animal suscetível à infecção
estreptocócica que compreende a administração ao referido
animal de uma quantidade terapêutica ou profilática das
composições da invenção.

A invenção também fornece composições da invenção para
30 uso das composições aqui descritas como um medicamento. Em

algumas modalidades, o medicamento desperta uma resposta imunológica em um mamífero (ou seja, ele é uma composição imunogênica). Em algumas modalidades, o medicamento é uma vacina.

- 5 A invenção também fornece o uso das composições da invenção na fabricação de um medicamento para despertar uma resposta imunológica em um mamífero. Em algumas modalidades, o medicamento é uma vacina.

- 10 A invenção também fornece kits que compreendem um ou mais recipientes de composições da invenção. As composições podem estar em forma líquida ou podem ser liofilizadas, bem como antígenos individuais. Recipientes adequados para as composições incluem, por exemplo, garrafas, frascos, seringas e tubos de ensaio. Os recipientes podem ser
- 15 formados por diversos materiais, incluindo vidro ou plástico. Um recipiente pode ter uma entrada de acesso estéril (por exemplo, o recipiente pode ser uma bolsa de solução intravenosa ou um frasco que possui uma tampa que possa ser perfurada por uma agulha de injeção hipodérmica).
- 20 A composição pode compreender um primeiro componente que compreende uma ou mais fímbrias gram-positivas (por exemplo, de *S. pneumoniae*) ou proteínas da fímbria. Em algumas modalidades, as fímbrias gram-positivas ou proteínas da fímbria estão em uma forma oligomérica ou
- 25 hiperoligomérica.

- O kit pode ainda compreender um segundo recipiente que compreende um tampão farmacologicamente aceitável, por exemplo, solução salina tamponada com fosfato, solução de Ringer ou solução de dextrose. Ele também pode conter
- 30 outros materiais úteis ao usuário final, incluindo outros

tampões, diluentes, filtros, agulhas e seringas. O kit também pode compreender um segundo ou terceiro recipiente com outro agente ativo, por exemplo, um antibiótico.

O kit também pode compreender uma bula que contenha
5 instruções escritas para os métodos de indução de imunidade contra uma bactéria gram-positiva (por exemplo, *S. pneumoniae*) ou para o tratamento de infecções bacterianas gram-positivas. A bula pode ser uma versão preliminar não aprovada da bula ou pode ser uma bula aprovada pelo FDA
10 ("Food and Drug Administration" - agência governamental americana que regula e fiscaliza a fabricação de comestíveis, drogas e cosméticos) ou por outra agência reguladora.

A invenção também fornece um dispositivo de liberação
15 pré-preenchido com as composições imunogênicas da invenção.

A invenção também fornece métodos para a indução de uma resposta imunológica em um mamífero que compreendem a etapa de administração de uma quantidade eficaz de uma composição da invenção. A resposta imunológica é, em
20 algumas modalidades, protetora e, em algumas modalidades, envolve imunidade por anticorpos e/ou imunidade mediada por células. Essa resposta imunológica preferivelmente induzirá imunidade por anticorpos duradoura (por exemplo, neutralização) e uma imunidade mediada por células que
25 possa responder rapidamente mediante exposição a um ou mais antígenos gram-positivos (por exemplo, de *S. pneumoniae*). O método pode despertar uma resposta de reforço.

A invenção fornece um método de neutralização de uma infecção bacteriana gram-positiva (por exemplo, por *S.*
30 *pneumoniae*) em um mamífero que compreende a administração

ao mamífero de uma quantidade eficaz das composições imunogênicas da invenção, uma vacina da invenção ou anticorpos que reconhecem uma composição imunogênica da invenção.

5 Em algumas modalidades, o mamífero é um ser humano. Quando a vacina for para uso profilático, o ser humano poderá ser do sexo masculino ou feminino (uma criança ou um adolescente). Alternativamente, o ser humano pode ser um idoso (por exemplo, acima 50, 55, 60, 65, 70 ou 75 anos de
10 idade) e pode ter uma doença subjacente como, por exemplo, diabetes ou câncer. Em algumas modalidades, o ser humano é uma mulher grávida ou um adulto idoso.

Em algumas modalidades, esses usos e métodos são para a prevenção e/ou o tratamento de uma doença causada por uma
15 bactéria gram-positiva (por exemplo, *S. pneumoniae*). As composições também podem ser eficazes contra outras bactérias estreptocócicas. As composições também podem ser eficazes contra outras bactérias gram-positivas.

Um método para verificar a eficácia do tratamento
20 terapêutico envolve o monitoramento da infecção bacteriana gram-positiva (por exemplo, por *S. pneumoniae*) após a administração de uma ou mais composições da invenção. As respostas imunológicas contra os antígenos gram-positivos (por exemplo, de *S. pneumoniae*) nas composições da invenção
25 podem ser monitoradas após a administração das composições.

Um método não limitante de avaliação da imunogenicidade das proteínas componentes das composições imunogênicas da presente invenção é a expressão das proteínas de forma recombinante e pesquisar o soro do
30 paciente ou suas secreções mucosas por *imunoblot*. Uma

reação positiva entre a proteína e o soro do paciente indica que o paciente desenvolveu previamente uma resposta imunológica à proteína em questão, ou seja, a proteína é um imunógeno. Esse método também pode ser usado para
5 identificar proteínas e/ou epitopos imunodominantes.

Outro método não limitante de verificação da eficácia do tratamento terapêutico envolve o monitoramento da infecção bacteriana gram-positiva (por exemplo, por *S. pneumoniae*) após administração das composições da invenção.
10 Um meio de verificar a eficácia do tratamento profilático envolve o monitoramento das respostas imunológicas tanto sistemicamente (por exemplo, monitoramento do nível de produção de IgG1 e IgG2a) quanto nas mucosas (por exemplo, monitoramento do nível de produção de IgA) contra os
15 antígenos gram-positivos (por exemplo, de *S. pneumoniae*) nas composições da invenção após administração da composição. Tipicamente, respostas de anticorpos séricos específicos para bactérias gram-positivas são determinadas pós-imunização, mas pré-ataque.

20 As composições de vacina da presente invenção podem, em algumas modalidades, ser avaliadas em modelos animais *in vitro* e *in vivo* antes da administração ao hospedeiro, por exemplo, ao ser humano.

A eficácia de composições imunogênicas da invenção
25 também pode ser determinada *in vivo* atacando-se modelos animais de infecção por bactérias gram-positivas (por exemplo, por *S. pneumoniae*), por exemplo, porquinhos-da-índia ou camundongos, com as composições imunogênicas. As composições imunogênicas podem ou não ser derivadas dos
30 mesmos sorotipos que os sorotipos de ataque. Em algumas

modalidades, as composições imunogênicas são deriváveis dos mesmos sorotipos que os sorotipos de ataque. Em algumas modalidades, a composição imunogênica e/ou os sorotipos de ataque são deriváveis do grupo de sorotipos gram-positivos
5 (por exemplo, de *S. pneumoniae*).

Modelos de eficácia *in vivo* incluem, sem limitação:
(i) um modelo de infecção murídeo que utiliza sorotipos de bactérias gram-positivas humanas (por exemplo, de *S. pneumoniae*); (ii) um modelo de doença murídeo que é um
10 modelo murídeo que usa uma cepa de bactérias gram-positivas adaptada ao camundongo (por exemplo, *S. pneumoniae*), tais como aquelas cepas que são particularmente virulentas em camundongos e (iii) um modelo primata que usa isolados de bactérias gram-positivas humanas (por exemplo, de *S.*
15 *pneumoniae*).

A resposta imunológica pode ser uma ou ambas de uma resposta imunológica TH1 e uma resposta TH2.

A resposta imunológica pode ser uma resposta imunológica aumentada ou intensificada ou uma resposta
20 imunológica alterada.

A resposta imunológica pode ser uma ou ambas de uma resposta imunológica sistêmica e uma resposta imunológica mucosa.

Em algumas modalidades, a resposta imunológica é uma
25 resposta sistêmica e/ou mucosa aumentada.

Uma imunidade sistêmica e/ou de mucosa aumentada é refletida em uma resposta imunológica TH1 e/ou TH2 aumentada. Em algumas modalidades, a resposta imunológica aumentada inclui um aumento na produção de IgG1 e/ou IgG2a
30 e/ou IgA.

Em algumas modalidades, a resposta imunológica mucosa é uma resposta imunológica TH2. Em algumas modalidades, a resposta imunológica mucosa inclui um aumento na produção de IgA.

5 Células TH2 ativadas aumentam a produção de anticorpo e são, portanto, úteis na resposta às infecções extracelulares. Células TH2 ativadas podem secretar um ou mais de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. Uma resposta imunológica TH2 pode resultar na produção de IgG1, IgE, IgA e células B
10 de memória para proteção futura.

Uma resposta imunológica TH2 pode incluir um ou mais de um aumento em uma ou mais das citocinas associadas a uma resposta imunológica TH2 (por exemplo, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10), ou um aumento na produção de IgG1, IgE, IgA e
15 células B de memória. Em algumas modalidades, a resposta imunológica TH2 aumentada incluirá um aumento na produção de IgG1.

Uma resposta imunológica TH1 pode incluir um ou mais de um aumento em CTLs, um aumento em uma ou mais das
20 citocinas associadas a uma resposta imunológica TH1 (por exemplo, IL-2, IFN- γ e TNF- β), um aumento em macrófagos ativados, um aumento da atividade de NK ou um aumento na produção de IgG2. Em algumas modalidades, a resposta imunológica TH1 aumentada incluirá um aumento na produção
25 de IgG2.

As composições imunogênicas da invenção, em particular, as composições imunogênicas que compreendem um ou mais antígenos de fímbrias gram-positivas (por exemplo, de *S. pneumoniae*) da presente invenção, podem ser usadas
30 tanto isoladamente quanto em combinação com outros

antígenos, opcionalmente com um agente imunorregulador capaz de despertar uma resposta Th1 e/ou Th2.

As composições da invenção geralmente serão administradas diretamente a um paciente. Certas vias podem ser favoráveis a certas composições, na medida em que resultam na geração de uma resposta imunológica mais eficaz, preferivelmente uma resposta CMI, ou em que possuem menor probabilidade de induzir efeitos colaterais, ou em que são mais fáceis para administração. A liberação direta pode ser obtida por injeção parenteral (por exemplo, subcutânea, intraperitoneal, intradérmica, intravenosa, intramuscular ou no espaço intersticial de um tecido), ou por administração retal, oral (por exemplo, comprimido, spray), vaginal, tópica, transdérmica (por exemplo, veja WO 99/27961) ou transcutânea (por exemplo, veja WO 02/074244 e WO 02/064162), intranasal (por exemplo, veja WO 03/028760), ocular, aural, pulmonar ou a outra mucosa.

Em algumas modalidades, a invenção pode ser usada para despertar imunidade sistêmica e/ou mucosa.

Em algumas modalidades, a composição imunogênica compreende um ou mais antígenos de fímbrias gram-positivas (por exemplo, de *S. pneumoniae*) que despertam uma resposta de anticorpo neutralizante e um ou mais antígenos de fímbrias gram-positivas (por exemplo, de *S. pneumoniae*) que despertam uma resposta imunológica mediada por células. Em algumas modalidades, a resposta de anticorpo neutralizante evita ou inibe uma infecção bacteriana gram-positiva inicial, enquanto a resposta imunológica mediada por células capaz de despertar uma resposta celular Th1 aumentada evita a disseminação posterior da infecção. A

composição imunogênica pode incluir um ou mais antígenos de fímbrias gram-positivas e um ou mais antígenos que não são de fímbrias gram-positivas, por exemplo, antígenos citoplasmáticos. Em algumas modalidades, a composição
5 imunogênica compreende um ou mais antígenos de superfície gram-positivos ou semelhantes e um ou mais antígenos, por exemplo, um antígeno citoplasmático capaz de despertar uma resposta celular Th1.

A dosagem do tratamento pode ser um esquema de dose
10 única ou um esquema de doses múltiplas. Doses múltiplas podem ser usadas em um esquema de imunização primária e/ou em um esquema de imunização de reforço. Em um esquema de doses múltiplas, as várias doses podem ser dadas pela mesma via ou por vias diferentes, por exemplo, uma dose inicial
15 parenteral e um reforço mucoso, uma dose inicial mucosa e um reforço parenteral etc.

As composições da invenção podem ser preparadas em várias formas. Por exemplo, as composições podem ser preparadas como injetáveis, tanto como soluções líquidas
20 quanto como suspensões. Formas sólidas adequadas para solução, ou suspensão, em veículos líquidos, antes da injeção, também podem ser preparadas (por exemplo, uma composição liofilizada). A composição pode ser preparada para administração tópica, por exemplo, como uma pomada,
25 creme ou pó. A composição pode ser preparada para administração oral, por exemplo, como um comprimido ou uma cápsula, como um spray ou como um xarope (opcionalmente flavorizado). A composição pode ser preparada para administração pulmonar, por exemplo, como um inalador, com
30 o uso de um pó fino ou um spray. A composição pode ser

preparada como um supositório ou pessário. A composição pode ser preparada para administração nasal, aural ou ocular, por exemplo, como gotas. A composição pode ser na forma de kit, projetado de tal forma que uma composição combinada seja reconstituída imediatamente antes da administração a um paciente. Esses kits podem compreender um ou mais antígenos em forma líquida e um ou mais antígenos liofilizados.

As composições imunogênicas usadas como as vacinas compreendem uma quantidade imunologicamente eficaz de antígeno(s), além de quaisquer outros componentes, por exemplo, antibióticos, como for necessário. O termo "quantidade imunologicamente eficaz" significa que a administração daquela quantidade a um indivíduo, tanto em uma dose única quanto como parte de uma série, é eficaz para o tratamento ou a prevenção, ou para aumento de uma resposta imunológica mensurável, ou para evitar ou reduzir um sintoma clínico. Essa quantidade varia, dependendo da saúde e da condição física do indivíduo a ser tratado, da idade, do grupo taxonômico do indivíduo a ser tratado (por exemplo, primata não humano, primata etc.), da capacidade do sistema imunológico do indivíduo para sintetizar anticorpos, do grau de proteção desejado, da formulação da vacina, da avaliação do médico responsável pela situação médica e de outros fatores relevantes. Espera-se que a quantidade caia em uma faixa relativamente ampla que pode ser determinada por meio de experimentos de rotina.

Componentes adicionais da composição

As composições da invenção compreenderão tipicamente, além dos componentes mencionados acima, um ou mais

"veículos farmacêuticamente aceitáveis", que incluem qualquer veículo que, por si próprio, não induza a produção de anticorpos danosos ao indivíduo que recebe a composição. Veículos adequados são tipicamente macromoléculas grandes, lentamente metabolizadas como, por exemplo, proteínas, polissacarídeos, ácidos poliláticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos e agregados lipídicos (por exemplo, gotículas de óleo ou lipossomos). Esses veículos são bem conhecidos por aqueles habilitados na técnica. As vacinas também podem conter diluentes, por exemplo, água, solução salina, glicerol etc. Adicionalmente, substâncias auxiliares, por exemplo, agentes umidificantes ou emulsificantes, substâncias de tamponamento do pH, e semelhantes, podem estar presentes. Uma discussão detalhada sobre excipientes farmacêuticamente aceitáveis está disponível em Gennaro (2000) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy". 20ª ed., ISBN: 0683306472.

Adjuvantes

As vacinas da invenção podem ser administradas em conjunto com outros agentes imunorreguladores. Em particular, as composições incluirão normalmente um ou mais adjuvantes. Adjuvantes para uso com a invenção incluem, sem limitação, um ou mais dos seguintes apresentados abaixo:

A. Composições que contêm minerais

Composições que contêm minerais adequadas para uso como adjuvantes na invenção incluem sais minerais, tais como sais de alumínio e sais de cálcio. A invenção inclui sais minerais como, por exemplo, hidróxidos (por exemplo, oxihidróxidos), fosfatos (por exemplo, hidroxifosfatos,

ortofosfatos), sulfatos etc. (por exemplo, veja os capítulos 8 e 9 de "Vaccine Design" (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum), ou misturas de diferentes compostos minerais (por exemplo, uma mistura de
 5 um adjuvante fosfato e um adjuvante hidróxido, opcionalmente com um excesso do fosfato), com os compostos assumindo qualquer forma (por exemplo, gel, cristalina, amorfa etc.), e com adsorção aos sais sendo preferida. As composições que contêm minerais também podem ser formuladas
 10 como uma partícula de sal metálico (WO 00/23105).

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

B. Emulsões oleosas

15 Composições de emulsão oleosas adequadas para uso como adjuvantes na invenção incluem emulsões esqualeno-água, tais como MF59 (Esqualeno 5%, Tween 80TM 0,5% e SpanTM 85 0,5%, formuladas em partículas submícron com o uso de um microfluidificador). Veja WO 90/14837. Veja também Podda,
 20 "The adjuvanted influenza vaccinnnes with novel adjuvants: experience with the MF59-adjuvanted vaccinne", *Vaccine* (2001) 19: 2.673-2.680; Frey e cols., "Comparison of the safety, tolerability, and immunogenicity of a MF59-adjuvanted influenza vaccine and a non-adjuvanted influenza
 25 vaccine in non-elderly adults", *Vaccine* (2003) 21: 4.234-4.237. MF59 é usado como o adjuvante na vacina de subunidade trivalente do vírus influenza FLUADTM.

Em algumas modalidades, adjuvantes para uso nas composições são emulsões submícron óleo-em-água. Em algumas
 30 modalidades, emulsões submícron óleo-em-água para uso na

invenção são emulsões esqualeno/água que opcionalmente contêm quantidades variáveis de MTP-PE, por exemplo, uma emulsão submícron óleo-em-água que contém esqualeno 4-5% p/v, Tween 80TM 0,25-1,0% p/v (monooleato de polioxietilenossorbitano) e/ou SpanTM 85 0,25-1,0% (trioleato de sorbitano) e, opcionalmente, N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(P-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosfophoriloxi)-etilamina (MTP-PE), por exemplo, a emulsão submícron óleo-em-água conhecida como

10 "MF59" (Publicação Internacional N° WO 90/14837; Patentes U.S. N°s 6.299.884 e 6.451.325, aqui incorporados por referência em sua totalidade; e Ott e cols., "MF59 - Design and Evaluation of a Safe and Potent Adjuvant for Human Vaccines" em "Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant

15 Approach" (Powell, M.F. e Newman, M.J. eds.) Plenum Press, Nova York, 1995, pp. 277-296). MF59 contém Esqualeno 4-5% p/v (por exemplo, 4,3%), 0,25-0,5% p/v Tween 80TM, e 0,5% p/v Span 85TM e, opcionalmente, contém várias quantidades de MTP-PE, formulado em partículas submícron com o uso de

20 um microfluidificador, por exemplo, o microfluidificador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA). Por exemplo, MTP-PE pode estar presente em uma quantidade de cerca de 0-500 µg/dose, cerca de 0-250 µg/dose e cerca de 0-100 µg/dose. Como aqui usado, o termo "MF59-0" refere-se à emulsão

25 submícron óleo-em-água acima desprovida de MTP-PE, enquanto o termo "MF59-MTP" representa uma formulação que contém MTP-PE. Por exemplo, "MF59-100" contém 100 µg de MTP-PE por dose, e assim por diante. MF69, outra emulsão submícron óleo-em-água para uso na invenção, contém esqualeno 4,3%

30 p/v, Tween 80TM 0,25% p/v e Span 85TM 0,75% p/v e,

opcionalmente, MTP-PE. Ainda outra emulsão submícron óleo-em-água é MF75, também conhecido como SAF, que contém esqualeno 10%, Tween 80TM 0,4%, 5% polímero bloqueado-plurônico L121 e thr-MDP, também microfluidizado em uma emulsão submícron. MF75-MTP representa uma formulação MF75 que inclui MTP, por exemplo, de 100-400 µg de MTP-PE por dose.

Emulsões submícron óleo-em-água, métodos de sua fabricação e agentes imunoestimulantes, por exemplo, muramil peptídeos, para uso nas composições, são descritos em detalhe na Publicação Internacional N° WO 90/14837 e Patentes U.S. N°s 6.299.884 e 6.451.325, aqui incorporados por referência em sua totalidade.

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

C. Formulações de saponina

Formulações de saponina também podem ser usadas como adjuvantes na invenção. Saponinas são um grupo heterólogo de glicosídeos de esterol e glicosídeos de triterpenóide que são encontrados na casca, folhas, caules, raízes e até mesmo nas flores de uma ampla gama de espécies de plantas. A saponina da casca da árvore Molina *Quillaia saponaria* foi amplamente estudada como adjuvante. A saponina também pode ser obtida comercialmente de *Smilax ornata* (sarsapilla), *Gypsophilla paniculata* (mosquitinho - brides veil) e *Saponaria officianalis* (saponária - soap root). Formulações adjuvantes de saponina incluem formulações purificadas, por exemplo, QS21, além de formulações lipídicas, por exemplo, ISCOMs.

Composições de saponina foram purificadas com o uso de cromatografia em camada delgada de alto rendimento (HP-LC) e cromatografia líquida de alto rendimento de fase reversa (RP-HPLC). Foram identificadas frações purificadas específicas com o uso dessas técnicas, incluindo QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B e QH-C. De preferência, a saponina é QS21. Um método de produção de QS21 é revelado na Patente U.S. N° 5.057.540. As formulações de saponina também podem compreender um esterol, por exemplo, colesterol (veja WO 96/33739).

Combinações de saponinas e colesteróis podem ser usadas para formar partículas únicas denominadas complexos imunoestimulantes (ISCOMs). ISCOMs tipicamente também incluem um fosfolípídeo, por exemplo, fosfatidiletanolamina ou fosfatidilcolina. Qualquer saponina conhecida pode ser usada em ISCOMs. Em algumas modalidades, o ISCOM inclui um ou mais de Quil A, QHA e QHC. ISCOMs são ainda descritos em EP0109942, WO 96/11711 e WO 96/33739. Opcionalmente, os ISCOMs podem ser desprovidos de detergente adicional. Veja WO 00/07621.

Uma revisão do desenvolvimento de adjuvantes baseados em saponina pode ser encontrada em Barr, *e cols.*, "ISCOMs and other saponin based adjuvants", *Advanced Drug Delivery Reviews* (1998) 32: 247-271. Veja também Sjolander, *e cols.*, "Uptake and adjuvant activity of orally delivered saponin and ISCOM vaccines", *Advanced Drug Delivery Reviews* (1998) 32: 321-338.

D. Virossomas e partículas semelhantes a vírus (VLPs)

Virossomas e partículas semelhantes a vírus (VLPs) também podem ser usadas como adjuvantes na invenção. Essas

estruturas geralmente contêm uma ou mais proteínas de um vírus, opcionalmente combinadas ou formuladas com um fosfolipídeo. Elas são geralmente não patogênicas, não replicantes e, geralmente, não contêm nada do genoma viral

5 nativo. As proteínas virais podem ser produzidas de forma recombinante ou isoladas do vírus inteiro. Essas proteínas virais adequadas para uso em virossomas ou VLPs incluem proteínas derivadas do vírus influenza (por exemplo, HA ou NA), vírus da hepatite B (por exemplo, proteínas centrais

10 ou do capsídeo), vírus da hepatite E, vírus do sarampo, vírus *Sindbis*, rotavírus, vírus da febre aftosa, retrovírus, vírus de Norwalk, papiloma vírus do humano, HIV, RNA-fagos, Q β -fago (por exemplo, proteínas de revestimento), GA-fago, fr-fago, fago AP205 e Ty (por

15 exemplo, proteína do retrotransposon Ty p1). VLPs são discutidos ainda em WO 03/024480, WO 03/024481 e Niikura e cols., "Chimeric Recombinant Hepatitis E Virus-Like Particles as an Oral Vaccine Vehicle Presenting Foreign Epitopes", *Virology* (2002) 293: 273-280; Lenz e cols.,

20 "Papillomaviruses-Like Particles Induce Acute Activation of Dendritic Cells", *Journal of Immunology* (2001) 5.246-5.355; Pinto, e cols., "Cellular Immune Responses to Human papillomavirus (HPV)-16 L1 Healthy Volunteers Immunized with Recombinant HPV-16 L1 Virus-Like Particles", *Journal*

25 *of Infectious Diseases* (2003) 188: 327-338; e Gerber e cols., "Human papillomavirus Virus-Like Particles Are Efficient Oral Immunogens when Coadministered with *Escherichia coli* Heat-Labile Enterotoxin Mutant R192G or CpG", *Journal of Virology* (2001) 75(10): 4.752-4.760.

30 Virossomas são discutidos ainda, por exemplo, em Gluck e

cols., "New Technology Platforms in the Development of Vaccines for the Future", *Vaccine* (2002) 20: B10-B16. Virossomas de influenza imunopotencializadores reconstituídos (IRIV) são usadas como o sistema de liberação de antígeno de subunidade no produto intranasal trivalente INFLEXAL™ (Mischler & Metcalfe (2002) *Vaccine* 20 Supl. 5: B17-23) e no produto INFLUVAC PLUS™.

E. Derivados bacterianos ou microbianos

Em algumas modalidades, adjuvantes adequados para uso na invenção incluem derivados bacterianos ou microbianos como, por exemplo:

(1) Derivados atóxicos de lipopolissacarídeo enterobacteriano (LPS)

Esses derivados incluem monofosforil lipídeo A (MPL) e MPL 3-O-desacilado (3dMPL). 3dMPL é uma mistura de monofosforil lipídeo A 3 des-O-acilado com 4, 5 ou 6 cadeias aciladas. Um exemplo não limitante de uma "pequena partícula" de monofosforil lipídeo A 3 des-O-acilado é revelado em EP 0 689 454. Essas "pequenas partículas" de 3dMPL são suficientemente pequenas para serem esterilizadas por filtração por meio de uma membrana de 0,22 micron (veja EP 0 689 454). Outros derivados atóxicos de LPS incluem miméticos de monofosforil lipídeo A, por exemplo, derivados de fosfato de aminoalquil glicosaminida, por exemplo, RC-529. Veja Johnson e cols. (1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9: 2.273-2.278.

(2) Derivados de lipídeo A

Derivados de lipídeo A incluem derivados de lipídeo A de *Escherichia coli*, por exemplo, OM-174. OM-174 é descrito, por exemplo, em Meraldi e cols., "OM-174, a New

Adjuvant with a Potential for Human Use, Induces a Protective Response with Administered with the Synthetic C-Terminal Fragment 242-310 from the circumsporozoite protein of *Plasmodium berghei*", *Vaccine* (2003) 21: 2.485-2.491; e
 5 Pajak, e cols., "The Adjuvant OM-174 induces both the migration and maturation of murine dendritic cells in vivo", *Vaccine* (2003) 21: 836-842.

(3) Oligonucleotídeos imunoestimulantes

Oligonucleotídeos imunoestimulantes adequados para uso
 10 como adjuvantes na invenção incluem seqüências de nucleotídeos que contêm um padrão CpG (uma seqüência que contém uma citosina não metilada, seguida por guanossina, e ligada por uma ligação fosfato). RNA bacteriano de fita dupla ou oligonucleotídeos que contêm seqüências
 15 palindrômicas ou poli(dG) também demonstraram ser imunoestimulantes.

Os CpGs podem incluir modificações/análogos de nucleotídeos como, por exemplo, modificações fosforotioato, e podem ser de fita dupla ou de fita simples.
 20 Opcionalmente, a guanossina pode ser substituída com um análogo como, por exemplo, 2'-desoxi-7-deazaguanossina. Veja Kandimalla, e cols., "Divergent synthetic nucleotide motif recognition pattern: design and development of potent immunomodulatory oligodeoxyribonucleotide agents with
 25 distinct cytokine induction profiles", *Nucleic Acids Research* (2003) 31(9): 2.393-2.400; WO 02/26757 e WO 99/62923 para exemplos de possíveis substituições análogas. O efeito adjuvante de oligonucleotídeos CpG é ainda discutido em Krieg, "CpG motifs: the active ingredient in
 30 bacterial extracts?", *Nature Medicine* (2003) 9(7): 831-835;

McCluskie, e cols., "Parenteral and mucosal prime-boost immunization strategies in mice with hepatitis B surface antigen and CpG DNA", *FEMS Immunology and Medical Microbiology* (2002) 32: 179-185; WO 98/40100; Patente U.S. N° 6.207.646; Patente U.S. N° 6.239.116 e Patente U.S. N° 6.429.199.

A sequência CpG pode ser dirigida a TLR9, por exemplo, o padrão GTCGTT (ID. DE SEQ. N°: 54) ou TTCGTT (ID. DE SEQ. N°: 55). Veja Kandimalla, e cols., "Toll-like receptor 9: modulation of recognition and cytokine induction by novel synthetic CpG DNAs", *Biochemical Society Transactions* (2003) 31 (parte 3): 654-658. A sequência CpG pode ser específica para a indução de uma resposta imunológica Th1, por exemplo, um ODN CpG-A, ou ela pode ser mais específica para a indução de uma resposta de célula B, por exemplo, um ODN CpG-B. ODNs CpG-A e CpG-B são discutidos em Blackwell, e cols., "CpG-A-Induced Monocyte IFN-gamma-Inducible Protein-10 Production is Regulated by Plasmacytoid Dendritic Cell Derived IFN-alpha", *J. Immunol.* (2003) 170(8): 4.061-4.068; Krieg, "From A to Z on CpG", *TRENDS in Immunology* (2002) 23(2): 64-65 e WO 01/95935. De preferência, o CpG é um ODN CpG-A.

Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo CpG é construído de forma que a extremidade 5' seja acessível para reconhecimento de receptor. Opcionalmente, duas sequências de oligonucleotídeos CpG podem ser anexadas em suas extremidades 3' para formar "imunômeros". Veja, por exemplo, Kandimalla, e cols., "Secondary structures in CpG oligonucleotides affect immunostimulatory activity", *BBRC* (2003) 306: 948-953; Kandimalla, e cols., "Toll-like

receptor 9: modulation of recognition and cytokine induction by novel synthetic GpG DNAs", *Biochemical Society Transactions* (2003) 31 (parte 3): 664-658; Bhagat e cols., "CpG penta- e hexadeoxyribonucleotides as potent immunomodulatory agents" *BBRC* (2003) 300: 853-861 e WO 03/035836.

(4) Toxinas de ribosilação de ADP e derivados detoxificados destas

Toxinas bacterianas de ribosilação de ADP e derivados detoxificados destas podem ser usadas como adjuvantes na invenção. Em algumas modalidades, a proteína é derivada de *E. coli* (ou seja, enterotoxina termolábil de *E. coli* "LT"), cólera ("CT") ou pertussis ("PT"). O uso de toxinas de ribosilação de ADP detoxificadas como adjuvantes mucosos é descrito em WO 95/17211, e como adjuvantes parenterais em WO 98/42375. Em algumas modalidades, o adjuvante é um mutante detoxificado de LT como, por exemplo, LT-K63, LT-R72 e LTR192G. O uso de toxinas de ribosilação de ADP e derivados detoxificados destas, particularmente LT-63 e LT-R72, como adjuvantes pode ser encontrado nas seguintes referências, cada uma delas sendo aqui especificamente incorporada por referência em sua totalidade: Beignon, e cols., "The LTR72 Mutant of Heat-Labile Enterotoxin of *Escherichia coli* Enhances the Ability of Peptide Antigens to Elicit CD4+ T Cells and Secrete Gamma Interferon after Coapplication onto Bare Skin", *Infection and Immunity* (2002) 70(6): 3.012-3.019; Pizza, e cols., "Mucosal vaccines: non toxic derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants", *Vaccine* (2001) 19: 2.534-2.541; Pizza, e cols., "LTK63 and LTR72, two mucosal adjuvants ready for clinical

trials" *Int. J. Med. Microbiol.* (2000) 290(4-5): 455-461;
 SchartonKersten e cols., "Transcutaneous Immunization with
 Bacterial ADP-Ribosylating Exotoxins, Subunits and
 Unrelated Adjuvants", *Infection and Immunity* (2000) 68(9):
 5 5.306-5.313; Ryan e cols., "Mutants of *Escherichia coli*
 Heat-Labile Toxin Act as Effective Mucosal Adjuvants for
 Nasal Delivery of an Acelular Pertussis Vaccine:
 Differential Effects of the Nontoxic AB Complex and Enzyme
 Activity on Th1 and Th2 Cells" *Infection and Immunity*
 10 (1999) 67(12): 6.270-6.280; Partidos e cols., "Heat-labile
 enterotoxin of *Escherichia coli* and its site- directed
 mutant LTK63 enhance the proliferative and cytotoxic T-cell
 responses to intranasally co-immunized synthetic peptides",
Immunol. Lett. (1999) 67(3): 209-216; Peppoloni e cols.,
 15 "Mutants of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxina
 as safe and strong adjuvants for intranasal delivery of
 vaccines", *Vaccines* (2003) 2(2): 285-293; e Pine e cols.,
 (2002) "Intranasal immunization with influenza vaccine and
 a detoxified mutant of heat labile enterotoxin from
 20 *Escherichia coli* (LTK63)" *J. Control Release* (2002) 85(1-
 3): 263-270. As referências numéricas para substituições de
 aminoácidos são preferivelmente com base nos alinhamentos
 das subunidades A e B de toxinas de ribosilação de ADP
 apresentados em Domenighini e cols., *Mol. Microbiol.* (1995)
 25 15(6): 1.165-1.167, aqui especificamente incorporado por
 referência em sua totalidade.

F. Bioadesivos e mucoadesivos

Bioadesivos e mucoadesivos também podem ser usados
 como adjuvantes na invenção. Bioadesivos adequados incluem
 30 microesferas de ácido hialurônico esterificado (Singh e

cols. (2001) *J. Cont. Rele.* 70: 267-276) ou mucoadesivos como, por exemplo, derivados entrecruzados de poli(ácido acrílico), álcool polivinílico, polivinil pirrolidona, polissacarídeos e carboximetilcelulose. Quitosana e
5 derivados desta também podem ser usados como adjuvantes na invenção. Por exemplo, veja WO 99/27960.

G. Micropartículas

Micropartículas também podem ser usadas como adjuvantes na invenção. Micropartículas (ou seja,
10 partículas de ~100 nm a ~150 µm de diâmetro, de ~200 nm a ~30 µm de diâmetro, e de ~500 nm a ~10 µm de diâmetro), formadas por materiais que são biodegradáveis e atóxicos (por exemplo, um poli(ácido α-hidróxi), um ácido poli-hidróxi butírico, um poliortoéster, um polianidrido, uma
15 policaprolactona etc.), com poli(lactida-co-glicolida), são preferidas, opcionalmente tratadas para ter uma superfície carregada negativamente (por exemplo, com SDS) ou a superfície carregada positivamente (por exemplo, com um detergente catiônico, por exemplo, CTAB).

H. Lipossomos

Exemplos de formulações de lipossomo adequadas para uso como adjuvantes são descritas na Patente U.S. N° 6.090.406, Patente U.S. N° 5.916.588 e EP 0 626 169.

I. Formulações de éter de polioxietileno e éster de polioxietileno

Em algumas modalidades, adjuvantes adequados para uso na invenção incluem éteres de polioxietileno e ésteres de polioxietileno. WO 99/52549. Essas formulações ainda incluem tensoativos de éster de polioxietileno sorbitano em
30 combinação com um octoxinol (WO 01/21207), além de

tensoativos de éteres ou éster de polioxietileno alquil em combinação com pelo menos um tensoativo não iônico adicional como, por exemplo, um octoxinol (WO 01/21152).

Em algumas modalidades, éteres de polioxietileno são selecionados do seguinte grupo: polioxietileno-9-lauril éter (laureth 9), polioxietileno-9-esteoril éter, polioxietileno-8-esteoril éter, polioxietileno-4-lauril éter, polioxietileno-35-lauril éter e polioxietileno-23-lauril éter.

10 ***J. Polifosfazeno (PCPP)***

Formulações de PCPP são descritas, por exemplo, em Andrianov e cols., "Preparation of hydrogel microspheres by coacervation of aqueous polyphosphazene solutions", *Biomaterials* (1998) 19(1-3): 109-115 e Payne e cols., "Protein Release from Polyphosphazene Matrices", *Adv. Drug Delivery Review* (1998) 31(3): 185-196.

K. Muramil peptídeos

Exemplos de muramil peptídeos adequados para uso como adjuvantes na invenção incluem N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-1-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP) e N-acetilmuramil-1-alanil-D-isoglutaminil-1-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE).

L. Compostos de imidazoquinolona

Exemplos de compostos de imidazoquinolona adequados para uso como adjuvantes na invenção incluem, sem limitação, Imiquamod e seus homólogos, descritos com mais detalhe em Stanley, "Imiquimod and the imidazoquinolones: mechanism of action and therapeutic potential" *Clin. Exp. Dermatol.* (2002) 27(7): 571-577 e Jones, "Resiquimod 3M",

Curr. Opin. Investig. Drugs (2003) 4(2): 214-218.

A invenção também fornece composições que compreendem combinações dos adjuvantes identificados acima. Por exemplo, as seguintes composições adjuvantes são exemplos
5 não limitantes de combinações de adjuvantes que podem ser usadas na invenção:

(1) uma saponina e uma emulsão óleo-em-água (WO 99/11241);

(2) uma saponina (por exemplo, QS21) + um derivado
10 atóxico de LPS (por exemplo, 3dMPL) (veja WO 94/00153);

(3) uma saponina (por exemplo, QS21) + um derivado atóxico de LPS (por exemplo, 3dMPL) + um colesterol;

(4) uma saponina (por exemplo, QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + um esteroide) (WO 98/57659);

15 (5) combinações de 3dMPL com, por exemplo, QS21 e/ou emulsões óleo-em-água (veja o Pedidos de patente europeia 0835318, 0735898 e 0761231);

(6) SAF, que contém Esqualano 10%, Tween 80 0,4%, polímero em bloco-plurônico 5% L121 e thr-MDP,
20 microfluidizado em uma emulsão submicron ou turbilhonado para gerar uma emulsão com tamanho de partícula maior.

(7) Sistema Ribi (RAS), (Ribi Immunochem), que contém Esqualeno 2%, Tween 80 0,2%, e um ou mais componentes da parede celular bacteriana do grupo que consiste em
25 monofosforilipídeo A (MPL), dimicolato de trehalose (TDM), e esqueleto da parede celular (CWS), preferivelmente MPL + CWS (DetoxTM);

(8) um ou mais sais minerais (por exemplo, um sal de alumínio) + um derivado atóxico de LPS (por exemplo,
30 3dPML).

(9) um ou mais sais minerais (por exemplo, um sal de alumínio) + um oligonucleotídeo imunoestimulante (por exemplo, uma seqüência de nucleotídeos que inclui um padrão CpG). A combinação N° (9) é uma combinação de adjuvantes
5 preferida.

M. Imunomoduladores humanos

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

Em algumas modalidades, sais de alumínio e MF59 são adjuvantes preferidos para uso com vacinas injetáveis de
15 influenza. Em algumas modalidades, toxinas e bioadesivos bacterianos são adjuvantes preferidos para uso com vacinas de liberação mucosa, por exemplo, vacinas nasais.

As composições imunogênicas da presente invenção podem ser administradas em combinação com um regime de tratamento
20 com antibiótico. Em algumas modalidades, o antibiótico é administrado antes da administração do antígeno da invenção ou da composição que compreende um ou mais dos antígenos da invenção.

Em algumas modalidades, o antibiótico é administrado
25 subsequente à administração de um ou mais antígenos da invenção ou da composição que compreende um ou mais antígenos da invenção. Exemplos de antibióticos adequados para uso no tratamento de infecções estreptocócicas incluem, sem limitação, penicilina ou um derivado desta ou
30 clindamicina ou semelhantes.

A invenção é adicionalmente ilustrada, sem limitação, pelos seguintes exemplos.

EXEMPLOS

Exemplo 1. Materiais e métodos

5 Construção de mutantes *pneumocócicos*

Cepas *pneumocócicas* e mutantes por eliminação criadas nesses produtos de base são descritas na Tabela 1. Mutagênese com ligação por PCR (23) foi usada para criar mutantes *knockout* de T4 e ST162^{19F}. Fragmentos acima e
10 abaixo dos genes-alvo foram amplificados com pares de iniciadores específicos. Os fragmentos acima foram construídos com sítios *ApaI* e os fragmentos abaixo com sítios *BamHI*. Os iniciadores usados para construção e rastreamento de alelos de eliminação estão listados na
15 Tabela 2. Os produtos de PCR (1.000 bp) foram digeridos com enzimas de restrição correspondentes, purificados e ligados com o cassete *erm* (1.306 bp) (número de acesso no GenBank AB057644) ou com o cassete *Kan-rpsL*, Janus (24) (1.368 bp), que contém sítios *ApaI* e *BamHI*. A mistura de ligação foi
20 então transformada, como descrito em (25), na cepa *pneumocócica* receptora, e plaqueada em placas de ágar-sangue contendo eritromicina (1 µg/ml) ou canamicina (400 µg/ml). A inserção correta foi confirmada por PCR e seqüenciamento.

25 Tabela 1. Cepas de *S. pneumoniae* usadas

Cepa	Características relevantes	Fonte
T4	TIGR4 cepa Tipo 4	tigr.org
T4Δ (<i>rlrA</i>)	<i>rlrA::erm</i> (Em ^R)	nesta
T4Δ (<i>rrgA-srtD</i>)	<i>rrgABC-srtBCD::erm</i> (Em ^R)	nesta

T4Δ (<i>mgrA</i>)	<i>mgrA::erm</i> (Em ^R)	nesta
T4Δ (<i>rrgA-srtD</i> , <i>mgrA</i>)	(<i>rrgABC-srtBCD::erm</i>) : <i>(mgrA::km-rpsL)</i> (Em ^R , Km ^R)	nesta
Δ (<i>rrgA-srtD</i>) ∇ (<i>rrgA-srtD</i>)	T4Δ (<i>rrgA-srtD</i>), em que (<i>rrgABC-srtBCD::erm</i> (Em ^R) foi substituído por (<i>rrgABC-srtBCD-Km</i>) (Km ^R)	nesta e (24)
T4R	Inativação Cm ^R de <i>cps4A</i> em T4	(27, 28)
T4RΔ (<i>rrgA-srtD</i>)	<i>rrgABC-srtBCD::erm</i> (Em ^R) em T4R	nesta
ST162 ¹⁹	Isolado clínico de tipo 19F, excelente colonizador em camundongos	(5)
ST162 ^{19F} Δ (<i>rrgA-srtD</i>)	<i>rrgABC-srtBCD::erm</i> (Em ^R)	nesta
ST162 ^{19F} Δ (<i>mgrA</i>)	<i>mgrA::erm</i> (Em ^R)	nesta
162 ^{19F} Δ (<i>rrgA-srtD</i> , <i>mgrA</i>)	<i>rrgABC-srtBCD::erm</i> (Em ^R), <i>mgrA::lan-rpsL</i> (Km ^R)	nesta
D39	Tipo 2 cepa desprovida da ilhota <i>rlrA</i>	(29)
D39V(<i>rrgA-srtD</i>)	ilhota <i>rlrA</i> <i>IS167::magellan5</i> (Spc ^R , Sm ^R)	nesta
D39 ∇ (<i>rrgA-srtD</i>) Δ (<i>rlrA</i>)	ilhota <i>rlrA</i> / <i>S167::magellan5</i> <i>rIrA::magellan2</i> (Spc ^R , Cm ^R , Sm ^R)	nesta

Em^R, resistente à eritromicina; Km^R, resistente à canamicina; Spc^R, resistente à espectinomicina; Sm^R,

resistente à estreptomicina; Cm^R , resistente à cloranfenicol.

Tabela 2. Iniciadores e enzimas de restrição usados na criação de mutantes

Gene	Nome	Enzima de restrição	Seqüências (5' para 3')
Cassete erm	ErmF	ApaI	TTTTTGGGCCCTTCGTGTTTCGTGCTGAC TTGC (ID. DE SEQ. N°: 18)
	ErmR	BamHI	TTTTTGGATCCGATGTTGCTGATTAAGA CGAGC (ID. DE SEQ. N°: 19)
	ErmstartR		AACTTCTTTTACGTTTCCGCC (ID. DE SEQ. N°: 20)
	ErmslutF		ACCGAAAGACAGACGAGCC (ID. DE SEQ. N°: 21)
Cassete Kan-rpsL	Kan-Bam	BamHI	TTGGATCCCTTTAAATACTGTAGAAAAG AGGA (ID. DE SEQ. N°: 22)
Kan-Apa		ApaI	TTGGGCCCTAAAACAATTCATCCAGTAA AAT (ID. DE SEQ. N°: 23)
Dam406		mHI	TCTATGCCTATTCCAGAGGAAATGGATC GGATC (ID. DE SEQ. N°: 24)
	Dam351	ApaI	CTAGGGCCCTTTCCTTATGCTTTTGGAC (ID. DE SEQ. N°: 25)
	Dam407		AGGAGACATTCCTTCCGTATCT (ID. DE SEQ. N°: 26)
	Dam352		CAAGAGCACAGCGTGGTGCT (ID. DE SEQ. N°: 27)
T4Δ (rrgA-srtD)	RrgA P1		CAAGGTCCAAACCTACTGAAC (ID. DE SEQ. N°: 28)
	RrgA P2	ApaI	GCGGGCCCCTGAGATATACAGCACAGTC

			C (ID. DE SEQ. N°: 29)
	SrtD P3	BamHI	CGGGATCCCTGGCATTCTGGGAATCCT G (ID. DE SEQ. N°: 30)
	SrtD P4		CGTTTCAAGTGCTATCACTGTTC (ID. DE SEQ. N°: 31)
T4Δ (mgrA)	MgrA P1		ATATAACATGAACAGTTGGGTCTTG (ID. DE SEQ. N°: 32)
	MgrA P2	ApaI	ATATAGGGCCCAACCTCTTGCAATTATA CCACA (ID. DE SEQ. N°: 33)
	MgrA P3	BamHI	ATATAGGATCCCGCGTTTGAAGTGTACC TCAA (ID. DE SEQ. N°: 34)
	MgrA P4		ATATACAGTAACTGTCTCATCCAAATC (ID. DE SEQ. N°: 35)
	MgrA C1		ATATACTGCTTCAATCCATTAGTTATTT C (ID. DE SEQ. N°: 36)
	MgrA C2		ATATATTGATTGTAAAAATTCCATCTAT AG (ID. DE SEQ. N°: 37)
T4Δ (rrgA- srtD) ▽(rrgA- srtD)	Rev1	BamHI	TTGGATCCTTATTTCCCTCGTAGTAAAC GT (ID. DE SEQ. N°: 38)
	Rev2	ApaI	TTGGGCCCAAAGAAATGAAAGGAAAGCT AAGG (ID. DE SEQ. N°: 39)
ST162 ^{19F} Δ (rrgA- srtD)	RrgA P1		CAAGGTCCAAACCTACTGAAC (ID. DE SEQ. N°: 40)
	RrgA P2	ApaI	GCGGGCCCCTGAGATATACAGCACAGTC C (ID. DE SEQ. N°: 41)
	SrtD P3	BamHI	CGGGATCCCTGGCATTCTGGGAATCCT

			G (ID. DE SEQ. N°: 42)
	SrtD P4		CGTTTCAAGTGCTATCACTGTTC (ID. DE SEQ. N°: 43)
	SrtD C2		GCCCCATCTTGCCCTCACTGCG (ID. DE SEQ. N°: 44)
ST162 ^{19F} Δ (mgrA)	MgrA P1		ATATAACATGAACAGTTGGGTTCTTG (ID. DE SEQ. N°: 45)
	MgrA P2	ApaI	ATATAGGGCCCAACCTCTTGCAATTATA CCACA (ID. DE SEQ. N°: 46)
	MgrA P3	BamIII	ATATAGGATCCCGCGTTTGAAGTGTACC TCAA (ID. DE SEQ. N°: 47)
	MgrA P4		ATATACAGTAACTGTCTCATCCAAATC (ID. DE SEQ. N°: 48)
	MgrA C1		ATATACTGCTTCAATCCATTAGTTATTT C (ID. DE SEQ. N°: 49)
	MgrA C2		ATATATTGATTGTAAAAATTCCATCTAT AG (ID. DE SEQ. N°: 50)
D39V (rrgA- srt) Δ(rlrA)	RLRAFR		CGCGGATCCAAAGGAGAATCATCATGCT AAACAAATACATTGA (ID. DE SEQ. N°: 51)
	RLRARX		CCCTCTAGATTATAACAAATAGTGAGCC TT (ID. DE SEQ. N°: 52)

Para criar um mutante de inserção de D39 (cepa do sorotipo 2) contendo a ilha *rlrA*, células D39 competentes foram transformadas com DNA genômico de CH155, uma cepa do sorotipo 4 de *S. pneumoniae* com uma inserção de transposon *magellan5* em um dos elementos *IS1167* que flanqueiam a ilha *rlrA*. O evento de recombinação duplo foi selecionado para plaqueamento em espectinomicina, e a presença da

ilhota foi confirmada por PCR. Para gerar um derivado mutante *rlrA* de D39V(*rrgA-srtD*), foi realizada a amplificação por PCR da região mutada na cepa do sorotipo 4 mutante com pares de iniciadores RLRAFR/RLRARX, e o
5 *amplicon* purificado transformado no fundo necessário do sorotipo 2. O evento de recombinação foi selecionado plaqueando-se em cloranfenicol para *rlrA* e confirmado por PCR.

Clonagem, expressão e purificação de RrgA, RrgB e RrgC

10 Técnicas padronizadas de DNA recombinante foram usadas para construir todos os plasmídeos de expressão. pET 21b+ foi adquirido de Invitrogen. PCR foi realizado com *Pfu* Turbo TaqTM (Roche) durante 25 ciclos de amplificação com DNA genômico. Os produtos de PCR foram purificados,
15 digeridos, ligados em um vetor, transformados em *E. coli* TOP010, e subsequêntemente subclonados em *E. coli* BLR(DE3). As proteínas recombinantes foram expressas e purificadas das bactérias transformadas de acordo com as instruções do fabricante.

Soros animais

20 *RrgA*, *RrgB* e *RrgC* recombinantes purificadas foram concentradas com uma coluna *spin* Centricon YM-30 (Millipore) e subsequêntemente usadas para imunizar camundongos BALB/C (20 µg) e coelhos brancos da Nova
25 Zelândia (100 µg).

Coloração negativa

Para coloração negativa, as bactérias cresceram em ágar-sangue por até 16 horas, e as colônias foram re-suspensas em tampão de cacodilato de sódio 0,15 M. Uma
30 alíquota de 4 µl foi adicionada a uma tela revestida com

uma película de suporte Formvar™ por 5 minutos. A solução em excesso foi retirada por um papel de filtro e a tela foi corada com acetato de uranil 0,5% em água por 5 segundos, e seca ao ar. As amostras foram examinadas em um microscópio eletrônico Tecnai™ 10 (Phillips) a 80 kV.

Microscopia imunoelétrica

S. pneumoniae cresceu de um dia para o outro em meio líquido THY. Um mililitro de suspensão bacteriana com uma OD₆₀₀ de 0,5 foi centrifugado a 3.000 rpm a 4°C e resuspenso em 500 µl de PBS filtrado estéril. Vinte microlitros de amostra foram adicionados a telas de níquel revestidas Formvar™ e deixados em repouso por 5 minutos. As telas foram subsequentemente fixadas em paraformaldeído 1%/PBS e incubadas com anticorpos policlonais de camundongo 1:10 para RrgA, RrgB ou RrgC em tampão de bloqueio (soro normal de coelho 1%, BSA 1%, 1x PBS). As amostras foram lavadas cinco vezes por 5 minutos em tampão de bloqueio, e incubadas com anticorpos secundários conjugados ao ouro a 1:20 (IgG de cabra anticamundongo, partículas de ouro de 5 nm; IgG de cabra anticoelho, 10 nm). As amostras foram lavadas cinco vezes em tampão de bloqueio por 5 minutos, e subsequentemente fixadas por 30 minutos em paraformaldeído 1%/PBS. As amostras foram lavadas em água destilada cinco vezes por 5 minutos, e deixadas para secar. As telas foram coradas por 15 segundos com acetato de uranil aquoso, e processadas em um microscópio eletrônico de transmissão de alto campo Tecnai™.

Western Blotting

As bactérias cresceram em placas de ágar-sangue por até 16 horas. As bactérias (peso líquido de 30 mg) foram

re-suspensas em 1 ml de 50 mM Tris-HCl, pH 6,8, contendo 400 unidades de Mutanolisina (Sigma), e incubadas por 2 horas a 37°C. Após três ciclos de congelamento e descongelamento, os restos celulares foram removidos por 5 centrifugação a 13.000 rpm por 15 minutos. Cinquenta microlitros do sobrenadante foram tratados com tampão de amostra NuPage™ e mercaptoetanol por 10 minutos a 70°C, e 10 µl foram carregados em um Gel NuPage Novex™ Bis-Tris 4-12% ou 3-8% (Invitrogen). O eletroblotting e a detecção com 10 anticorpo de RrgB (soros imunes de camundongo) diluído a 1:500 foram efetuados de acordo com as instruções do fornecedor.

Ensaio de aderência de A549

As células de *S. pneumoniae* cresceram até a fase 15 exponencial média ($OD_{600} = 0,3-0,4$), foram incubadas com células A549 por 30-40 minutos a 37°C sob a CO_2 5%/95% de atmosfera do ar, e lavadas três vezes com PBS (pH 7,4) para remover bactérias não aderentes. Para enumeração de bactérias aderentes e/ou internalizadas, as células 20 epiteliais foram destacadas dos poços por tratamento com 200 µl de tripsina 0,25%/1 mM EDTA, e lisadas pela adição de 800 µl de Triton X-100 0,025% gelado. As diluições apropriadas foram plaqueadas em placas de ágar-sangue para contar o número de bactérias aderentes às células 25 eucarióticas. A titulação das bactérias aderentes para cada cepa foi comparada com a titulação inserida, e a percentagem de bactérias aderentes foi determinada.

Para microscopia por fluorescência, monocamadas de A549 foram desenvolvidas em lâminulas em placas de cultura 30 de tecido de 24 poços. As camadas de células infectadas nas

lamínulas foram fixadas em paraformaldeído 3% e marcadas com anticorpos após a incubação de 30 a 40 minutos e lavagem com PBS. As bactérias foram marcadas com anticorpo anticapsular, e as células epiteliais foram visualizadas após permeabilização por coloração de F-actina com faloidina conjugada à rodamina. Todos os experimentos foram realizados em quadruplicata, e cada experimento foi replicado três vezes em dias diferentes.

Ataque ao camundongo

10 T4 e ST162^{19F} e seus respectivos mutantes isogênicos cresceram por 16 horas em placas de ágar-sangue a 37°C sob CO₂ 5%. As colônias foram retiradas diretamente das placas, e re-suspensas gentilmente em PBS até OD₆₂₀ = 0,5 ou inoculadas em meio semi-sintético C+Y e crescidas até a 15 fase logarítmica média (OD₆₂₀ = 0,5) para inoculação intranasal, e OD₆₂₀ = 0,2 para inoculação intraperitoneal (i.p.). Foram feitas diluições apropriadas para obter a concentração desejada. Camundongos C57BL/6 de 6 a 8 semanas de idade foram usados para ataque bacteriano intranasal e 20 i.p. de T4 e ST162^{19F} e seus mutantes, como descrito em (5). D39 e seus mutantes isogênicos cresceram em caldo THY suplementado com antibióticos apropriados. Fêmeas de camundongos CD1 (UK) de 6 a 10 semanas de idade (Charles River Laboratories) foram usadas para ataque intranasal com 25 1 x 10⁷ bactérias.

Para experimentos de competição, bactérias mutantes e do tipo selvagem foram misturadas em uma proporção de 1:1. O resultado da cfu do mutante comparada com a cfu do tipo selvagem foi determinado por seleção em placas de ágar-sangue com eritromicina, estreptomicina e/ou cloranfenicol. 30

Os índices de competição (CI) *in vivo* foram calculados como a proporção do resultado da cfu de mutante para a do tipo selvagem dividido pela cfu de entrada pelo mutante em relação ao tipo selvagem.

- 5 A determinação de TNF e IL-6 após ataque i.p. no soro foi realizada pela utilização de kits comerciais de ELISA (BD Biosciences).

Análise estatística

- 10 Os dados foram analisados quanto à significância estatística pela utilização de GraphPad PRISM™ Versão 4. As variáveis contínuas foram comparadas pela utilização do teste t ou do teste não paramétrico de Mann-Whitney. A significância estatística foi definida como $P < 0,05$.

Análise FACS

- 15 Isolados de *S. pneumoniae* [T4, ST1621^{9F}, T4Δ (*mgrA*) e T4Δ (*rrgA-srtD*)] cresceram em cultura líquida THY de um dia para o outro a 37°C sob CO₂ 5%. As amostras foram diluídas e permitiu-se que crescessem até OD₆₂₀ = 0,250 (~1 x 10⁸ por ml). As culturas bacterianas foram centrifugadas a 3.000
20 rpm, e re-suspensas em 1x PBS. Quinze microlitros de suspensão bacteriana foram adicionados a placas de 96 poços. Cinco microlitros de soro normal de coelho 20% foram adicionados a cada poço, juntamente com anticorpos primários (anti-RrgB, PI anti-RrgB, Nm anti-961) a 1:3.200.
25 As amostras foram incubadas no gelo por 30 minutos, e depois 150 µl de tampão de bloqueio (BSA 1%/PBS) foram adicionados aos poços. A placa de 96 poços foi centrifugada a 2.500 rpm por 5 minutos a 4°C. Um anticorpo secundário anticamundongo marcado com ficoeritrina (Jackson
30 ImmunoResearch) foi adicionado em uma concentração final de

1:100, e a mistura foi incubada por 30 minutos no gelo. A seguir, 150 µl de tampão de bloqueio foram adicionados, e as amostras foram centrifugadas como acima. As amostras foram re-suspensas em 200 µl de paraformaldeído 1%/PBS e
5 analisadas em um FACSCaliber™ (Becton Dickinson).

Criação de revertido em T4Δ (*rrgA-srtD*)

A ilha *rlrA* foi reintroduzida em T4Δ (*rrgA-srtD*) por reintrodução dos genes *knocked-out* junto com um cassete de canamicina. O cassete de canamicina primeiro foi integrado
10 abaixo dos genes-alvo na cepa T4 do tipo selvagem por mutagênese com ligação por PCR. O DNA cromossômico desses mutantes foi usado para transformar os *knockouts* e restaurar o fenótipo do tipo selvagem. Na primeira etapa, o cassete de canamicina foi amplificado de Janus (Sung e
15 cols., 2001, *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 5.190-6) com os iniciadores KanApa e Kan-Bam, criando um produto de PCR com terminais ApaI e BamHI. Fragmentos acima e abaixo dos sítios-alvo foram amplificados com iniciadores fímbrias-*rev-1-4* para o mutante T4Δ (*rrgA-srtD*). Os fragmentos acima
20 foram construídos com sítios ApaI, e os fragmentos abaixo com sítios BamHI. Todos os fragmentos foram digeridos com endonucleases de restrição correspondente, e foram feitas ligações com quantidades eqüimolares de fragmento acima, fragmento abaixo e fragmento de canamicina. Após
25 transformação em T4, foram selecionados transformantes em placas de ágar-sangue contendo 200 mg/l de canamicina. Após PCRs de controle confirmação da construção correta, DNA cromossômico desses transformantes foi usado para transformar T4Δ (*rrgA-srtD*). Novamente, a seleção foi feita
30 em placas contendo canamicina, e os mutantes foram

confirmados por verificação da sensibilidade à eritromicina e expressão de fímbrias.

Exemplo 2

Evidências por microscopia eletrônica de transmissão para estruturas semelhantes a fímbria em pneumococos

Por microscopia eletrônica de transmissão e coloração negativa, verificou-se que pneumococos cultivados por até 16 horas em placas de ágar-sangue e em meio (C+Y) ou (THY) expressam estruturas semelhantes a fímbria. Essas estruturas foram encontradas na cepa T4 (TIGR4), que pertence ao clone altamente invasivo do sorotipo 4 de sequência multilocus tipo ST205, bem como em um isolado clínico do tipo 19F, com sequência multilocus tipo 162 (cepa ST162^{19F}) (Fig. 1A). Esse clone 19F está associado tanto a casos de portadores quanto de doença invasiva em seres humanos, e demonstrou ser um colonizador eficiente do trato respiratório de camundongos C57BL/6 e BALB/C (5). Embora um mutante não encapsulado de T4 (T4R) fosse capaz de formar fímbrias, não foram observadas fímbrias na cepa de laboratório não encapsulada R6.

Exemplo 3

A ilha *rlrA* no genoma pneumocócico codifica estruturas fímbrias-like

A comparação do óperon *spaABC* de *Corynebacterium diphtheriae* (12) e adesão da ilha 1 de estreptococos do grupo B (16) revelou um agrupamento de supostos genes de fímbria dentro do genoma de T4 (Fig. 2). Os genes de fímbria estão localizados na ilha de patogenicidade de *Streptococcus pneumoniae* descrita previamente *rlrA* (18, 19). A ilha pneumocócica *rlrA* consiste em sete genes, dos

quais prevê-se que *rrgA*, *rrgB* e *rrgC* codificam componentes da superfície microbiana que contêm LPXTG que reconhecem moléculas adesivas da matriz (MSCRAMMs) que se ligam aos componentes da matriz extracelular do hospedeiro (20). Além disso, a ilha *rlrA* também contém genes para três sortases, *srtB*, *srtC* e *srtD*, além de *rlrA* (regulador *rofA-like*), um regulador positivo do agrupamento gênico (18) (Fig. 2). A ilha genômica é flanqueada por *IS1167* que contém repetições invertidas, características de elementos genéticos móveis (Fig. 2). A cepa seqüenciada R6 e sua progenitora D39 são desprovidas da ilha de fímbrias *rlrA* (Fig. 2). O repressor da transcrição *mgrA* se localiza externamente à ilha *rlrA*, e está envolvido na regulação dos genes de fímbria (21). A análise de seqüências após amplificação por PCR da região correspondente no isolado clínico ST162^{19F} do sorotipo 19F revelou um agrupamento gênico homólogo com 98% de identidade para a ilha *rlrA* de T4. No entanto, um pequeno ORF de função desconhecida em T4 estava ausente no isolado ST162^{19F}. Mutantes *knockout* com o gene *mgrA* eliminado de T4 e ST162^{19F} foram construídos por mutagênese com ligação por PCR produzindo, dessa forma, cepas que superexpressam os genes da ilha *rlrA*. Além disso, eliminamos a região *rrgA-srtD* em T4 (Fig. 1B) e ST162^{19F}, bem como em seus respectivos derivados *mgrA*. Mediante coloração negativa e microscopia eletrônica, verificou-se que os mutantes de T4 *mgrA* e ST162^{19F} *mgrA* produzem fímbrias abundantes (Fig. 1C), enquanto bactérias que contêm a eliminação *rrgA-srtD* não possuíam fímbrias no geral (Fig. 1D).

Foram desenvolvidos anti-soros contra proteínas RrgA,

RrgB e RrgC expressas em *Escherichia coli*, e usos na marcação por imuno-ouro da fímbria expressa por T4. Os anticorpos de RrgB decoravam todo o polímero da fímbria (Fig. 1 E-G). A análise FACS, que faz uso de anticorpos
5 específicos para RrgB, revelou que 84% e 90% das células de T4 e ST162^{19F}, respectivamente, expressavam estruturas de fímbrias. Nos derivados do mutante *mgrA*, quase todas as bactérias (99%) eram fimbriadas. As células desprovidas da ilha *rlrA* não tinham fímbrias medidas por análise FACS.

10 Para verificar a natureza polimérica das estruturas das fímbrias observadas em T4 e ST162^{19F}, extratos totais dessas cepas e seus respectivos derivados por eliminação *rrgA-srtD* foram tratados com mutanolisina, separados em géis de gradiente de poliacrilamida 4-12% (Fig. 3A) e 3-8%
15 (Fig. 3B), e submetidos a imunoblot com anti-soros específicos para RrgB. Foi observado um escalonamento de polímeros de alto peso molecular (HMW) variando de < 100 kDa até > 1.000 kDa, similares àqueles descritos previamente em *C. diphtheriae* (12, 13). Embora quantidades
20 iguais de extrato de proteína tenham sido carregadas no gel, as bandas coradas pelos anticorpos de RrgB eram mais intensas para os mutantes *mgrA* do que para suas respectivas cepas do tipo selvagem, corroborando os dados da microscopia eletrônica de transmissão e da análise FACS de
25 que uma percentagem maior de pneumococos expressava estruturas de fímbrias no mutante *mgrA*. Como esperado, os mutantes por eliminação de *rrgA-srtD*, em T4 e ST162^{19F}, respectivamente, não mostraram bandas reativas à RrgB (Fig. 3). No entanto, quando a ilha de fímbrias era
30 reintroduzida no mutante por eliminação T4Δ (*rrgA-srtD*), a

análise *Western blot* com o anti-soro de RrgB detectou polímeros HMW similares àqueles para a cepa de T4 do tipo selvagem. Utilizando-se *Western blotting*, foi observado que as fímbrias estavam presentes em cepas pneumocócicas
 5 cultivadas tanto em meios líquidos quanto em placas, embora as fímbrias nem sempre pudessem ser detectadas pela utilização de microscopia eletrônica de transmissão, explicando porque as fímbrias não haviam sido encontradas previamente.

10

Exemplo 4

A ilhota *rlrA* é importante para aderência pneumocócica às células epiteliais pulmonares

A cepa D39 do sorotipo 2, como seu derivado não encapsulado R6, não possui a ilhota *rlrA* (Fig. 2). A ilhota
 15 *rlrA* completa de T4 foi introduzida em D39 (D39V (*rrgA-srtD*)). Esse mutante de inserção da ilhota de D39 expressava fímbrias, como foi evidenciado por um escalonamento de polímeros HMW com base em *Western blotting* com anti-RrgB (Fig. 3B). A expressão de fímbrias em D39V
 20 (*rrgA-srtD*) era dependente do regulador positivo *rlrA*, pois não foram detectados polímeros HMW em um derivado do mutante de *rlrA* de D39V (*rrgA-srtD*) (Fig. 3B). D39, D39V (*rrgA-srtD*) e D39V (*rrgA-srtD*) Δ (*rlrA*) foram usados para estudar a aderência às células epiteliais pulmonares A549
 25 (Fig. 4). Somente D39V (*rrgA-srtD*) que expressa fímbrias se ligou a essas células (Fig. 4). Essa ligação era similar àquela de T4 que expressa fímbrias, enquanto um mutante *rlrA* de T4 não mostrou ligação detectável às células A549.

Exemplo 5

30 **A ilhota *rlrA* afeta a virulência em modelos de camundongo**

Para investigar o papel da fímbria na colonização pneumocócica e na doença invasiva, cepas T4 e T4 Δ (*rrgA-srtD*) foram usadas em modelos de infecção murídea. Para simular a via de infecção natural, camundongos C57BL/6 com
5 6 a 8 semanas de idade foram inoculados por via intranasal com doses altas [5×10^6 unidades formadoras de colônias (cfu)] e médias (5×10^5 cfu) de pneumococos. A colonização foi estimada realizando-se lavagens nasofaríngeas-traqueais em animais *post-mortem*. O mutante não fimbriado eram menos
10 virulento do que a cepa do tipo selvagem, como revelado por uma taxa de sobrevivência maior de camundongos infectados pelo mutante (Fig. 5A e 5B). Esse defeito na virulência podia ser restaurado por reintrodução da ilha *rlrA*.

Pneumococos tanto do tipo selvagem quanto mutante
15 administrados separadamente foram capazes de colonizar camundongos em um grau similar (não significativo pelo teste U de Mann-Whitney, $P > 0,05$). No entanto, quando números iguais de bactérias T4 do tipo selvagem e mutante foram dados juntos por via intranasal, o mutante deficiente em
20 fímbrias foi suplantado pelo tipo selvagem nas vias aéreas superiores, pulmões e sangue, na maioria dos casos (Fig. 5C-E). A cepa do tipo 2 D39, o derivado por inserção da ilha D39 ∇ (*rrgA-srtD*) e o mutante de *rlrA* D39 ∇ (*rrgA-srtD*) Δ (*rlrA*) também foram usados em experimentos de
25 competição para colonização nasofaríngea e pneumonia. O D39 do tipo selvagem não fimbriado foi suplantado pelo mutante de inserção de ilha fimbriado D39 ∇ (*rrgA-srtD*), enquanto o mutante desprovido de *rlrA* não o foi (Fig. 5F). Os dados atuais demonstram que as fímbrias pneumocócicas participam
30 da colonização, pneumonia e doença invasiva.

Exemplo 6**A ilhota *rlrA* tem uma participação nas respostas
inflamatórias do hospedeiro**

O surgimento de uma infecção pneumocócica é afetado
5 pela resposta inflamatória do hospedeiro, que pode promover
a depuração bacteriana, além de contribuir para o dano
local (pneumonia) ou dano sistêmico (do qual a forma mais
severa é o choque séptico). Demonstramos recentemente que
diversos clones pneumocócicos provocam respostas pró-
10 inflamatórias de citocina distintas, quando administrados
i.p. aos camundongos (26). Demonstrou-se aqui que uma cepa
do sorotipo 6B e as cepas T4 e ST1621^{9F} produzem fímbrias,
e todas provocaram uma resposta de TNF elevada após ataque
i.p. (5). Em contraste, uma cepa do sorotipo 19F de um tipo
15 clonal diferente, ST425^{19F}, não foi tão eficiente na
colonização das vias aéreas superiores de camundongos, e
provocaram uma resposta de TNF baixa (5). Isso também era
verdade para um isolado do sorotipo 1 e do sorotipo 7F (5,
22), que pertencem aos tipos clonais invasivos associados à
20 doença invasiva relativamente leve e ausência de
mortalidade em seres humanos (22). Esses clones foram
analisados quanto à presença da ilhota de fímbrias *rlrA* por
PCR, seqüenciamento e hibridização por *Southern blot*. Os
resultados demonstraram que cepas pneumocócicas ilhota
25 *rlrA*-positivas (ST205⁴ e ST162^{19F} do tipo 4 e 19F,
respectivamente) despertaram uma resposta de citocina
elevada, enquanto cepas ilhota *rlrA*-negativas (ST191^{7F},
ST228¹, e ST306¹ do tipo 7F e 1, respectivamente) induziram
uma resposta de TNF baixa (5). A presença ou ausência da
30 ilhota pneumocócica de fímbrias poderia, portanto, explicar

a diferença na resposta de TNF. Para testar essa possibilidade diretamente, a resposta inflamatória foi medida durante infecção pneumocócica invasiva após ataque dos camundongos i.p. com mutantes por eliminação fimbriados do tipo selvagem e *rrgA-srtD* desprovido de fímbrias. As infecções com os dois mutantes por eliminação também foram feitas com doses maiores de infecção para assegurar que as respostas de TNF baixas não eram causadas pelos números reduzidos de bactérias na corrente sanguínea. Os mutantes T4 por eliminação fimbriados, bem como os basais ST162^{19F}, mostraram uma resposta de TNF (Fig. 6) e uma resposta de IL-6 (Fig. 7) significativamente menores, comparados com suas respectivas cepas do tipo selvagem. Tabulando-se os valores de TNF contra os números de bactérias, ficou evidente que a resposta de TNF aos pneumococos fimbriados foi significativamente maior do que para o número equivalente de pneumococos não fimbriados (Fig. 6C e D). Além disso, a reintrodução da ilhota *rlrA* em T4Δ (*rrgA-srtD*) restaurou a alta resposta de TNF de T4 com fímbrias.

Esses resultados demonstram que *S. pneumoniae* produz estruturas semelhantes a fímbria que se projetam da superfície da célula bacteriana. A fímbria pneumocócica é codificada pela ilhota de fímbrias *rlrA*, encontrada em algumas, mas não em todas, as cepas pneumocócicas. No *S. pneumoniae* encapsulado, as fímbrias contribuem para a adesão de células epiteliais cultivadas, e para a colonização e doença invasiva em modelos murídeos de infecção. A expressão de fímbrias também aumenta a resposta inflamatória do hospedeiro. Pneumococos utilizam diversos mecanismos para interagir com seu hospedeiro em estágios

diferentes de infecção. A expressão de fímbrias pode facilitar a aderência bacteriana inicial, promovendo colonização da nasofaringe. Simultaneamente, bactérias que expressam essas estruturas podem ter uma tendência maior a desencadear inflamação mucosa que pode promover depuração, mas potencialmente também podem levar à invasão dos pneumococos no tecido, caso a inflamação leve ao dano da barreira mucosa.

Exemplo 7

10 Purificação de fímbrias de *Streptococcus pneumoniae*

Estoque de TIGR4 de *S. pneumoniae* em glicerol (-80°C) foi crescido em ágar soja tríptico suplementado com 5% sangue de carne de carneiro desfibrinado (de um dia para o outro a 37°C em CO₂ 5%). Foram usadas bactérias frescas para incubar novas placas de ágar, e cultivadas por cerca de 12 horas a 37°C em CO₂ 5%. As bactérias coletadas de cerca de 10 placas foram lavadas uma vez em 35 ml de PBS, e re-suspensas em 2 ml de tampão PPB de protoplasto (10 mM MgCl₂, 50 mM fosfato de sódio pH 6,3, 20% de sacarose) contendo conjunto de coquetel de inibidor de protease (Calbiochem). Cerca de 450 U de mutanolisina em 100 mM de fosfato de sódio pH 6,3 foram adicionadas a cada metade da suspensão, e incubadas a 37°C por cerca de 5 a 8 horas com agitação suave até a formação de protoplasto ser detectada por microscopia. O sobrenadante contendo material digerido de fímbrias foi carregado em um gradiente de sacarose (25 a 56% em 10 mM MgCl₂, 50 mM fosfato de sódio pH 6,3) e processado por cerca de 20 horas a 38.000 rpm a 4°C (Fig. 10A). Todas as etapas posteriores foram realizadas a 4°C com o uso de tampões contendo inibidores de protease. Além

disso, nuclease BenzonaseTM (Novagen) foi adicionada para remover impurezas de DNA e RNA. As frações de gradiente coletadas foram testadas quanto ao material de fímbria com o uso de anticorpos anti-RrgB. Frações contendo fímbrias
5 foram reunidas em pool e dialisadas contra 10 mM MgCl₂, 50 mM fosfato de sódio pH 6,3 por cerca de um dia para remover a sacarose.

Para reduzir a polidispersibilidade, foram acrescentadas etapas adicionais de cromatografia. Quando
10 necessário, pools de preparações de fímbria foram concentrados antes de carregá-los em uma coluna de SuperoseTM 6 10/300 GL (Amersham Biosciences) (Fig. 10B). A filtração do gel resultou na separação de material fímbria contendo fímbrias de diferentes pesos moleculares. As
15 frações de fímbrias purificadas foram avaliadas como sendo homogêneas com base na microscopia eletrônica e em eletroforese em gel de sódio dodecil sulfato poliacrilamida e *imunoblot* com um anticorpo específico de RrgB (Fig. 10C). As amostras foram armazenadas a -80°C ou em nitrogênio
20 líquido até uso posterior.

Fímbrias purificadas de alto peso molecular mostraram massas moleculares que variam de 2×10^6 a 3×10^6 Da. O tratamento de fímbrias com calor na presença de SDS resultou em sua dissociação em moléculas menores, gerando
25 um escalonamento de bandas de peso molecular menor em um gel poliacrilamida-SDS. A degradação de Edmarm das fímbrias purificadas identificou uma sequência que corresponde ao terminal N previsto da proteína RrgB produzida por clivagem da sequência sinalizadora (AGTTTTSVTVHXL; ID. DE SEQ. N°:
30 56) (Fig. 11A). A análise da sequência de aminoácidos das

seqüências de peptídeo tríptico das fímbrias identificou um fragmento da proteína RrgB de pneumococo TIGR4 com a seqüência de aminoácidos LAGAEFV1ANADNAGQYLAR (ID. DE SEQ. N°: 7) (Fig. 11 B). Foi realizada a investigação com

5 microscopia eletrônica nas preparações de fímbrias purificadas coradas negativas (PTA 1%), marcadas por imuno-ouro. Foram observados filamentos tubulares alongados até 1 µm de comprimento e cerca de 10 µm de diâmetro, similares àqueles detectados em bactérias inteiras. Além de

10 filamentos de fímbrias únicos, foram observados feixes de estruturas individuais intensamente compactadas. Anti-soro contra RrgB e RrgC purificadas reagiram com fímbrias isoladas sob EM por imuno-ouro (Fig. 15) e na análise western (Fig. 10C). O padrão de marcação com ouro de anti-

15 RrgA, anti-RrgB e anti-RrgC é mostrado na Fig. 16.

Exemplo 8

Proteínas de fímbrias RrgA e RrgB se associam *in vitro*

As proteínas de fímbrias RrgA, RrgB e RrgC foram purificadas, como descrito no Exemplo 1. As preparações de

20 proteína purificada foram incubadas *in vitro* em temperatura ambiente, 37°C, 65°C e 95°C por 5 minutos. As preparações incubadas foram processadas em um gel desnaturante de poliacrilamida. Foram observados complexos de alto peso molecular nas preparações de RrgA e RrgB, mas não nas

25 preparações RrgC-His (Fig. 9A). A presença de RrgA e RrgB nos complexos de alto peso molecular foi confirmada por *Western blotting* (Fig. 9B). Também foram detectados complexos de alto peso molecular nas preparações de RrgA e RrgB por cromatografia por exclusão de tamanho (Fig. 9C).

Anti-soros preparados contra fímbrias são protetores contra infecção

Os camundongos foram atacados i.p. com bactérias T4, como descrito no Exemplo 1, exceto que os camundongos receberam a administração de anti-soros contra fímbrias purificadas (antifímbria), anti-soros contra a preparação purificada sob condições idênticas de bactérias que não produzem fímbrias (anti- Δ fímbria) ou controle de solução salina (ctrl). Em experimentos paralelos, os camundongos receberam a administração de anti-soros idênticos diluídos 1:10. Os animais foram observados ao longo de dez dias quanto à mortalidade, e a carga bacteriana foi medida em 24 horas pós-ataque. Todos os camundongos tratados com soros antifímbria não diluídos tiveram cargas bacterianas abaixo do nível de detecção; o tratamento com soros diluídos a 1:10 ainda gerou alguma proteção (Fig. 12A). Soros antifímbria tanto diluídos quanto não diluídos forneceram uma redução significativa da mortalidade, comparados com o controle de solução salina (Fig. 12B). Além disso, os soros preparados contra fímbrias forneceram maior proteção contra bacteremia e mortalidade do que os soros anti- Δ fímbria (Figs. 12A-B). Esse exemplo demonstra que soros específicos para fímbrias purificadas forneceram proteção significativa contra infecção por *S. pneumoniae* em um animal modelo.

Exemplo 10

Fímbrias purificadas e proteínas de fímbrias se ligam aos componentes da matriz extracelular

A ligação de RrgA, RrgB, RrgC, fímbrias purificadas e falsas fímbrias purificadas aos componentes extracelulares foi determinada por ELISA. A ligação de componentes de

fímbrias aos componentes da matriz extracelular mucina I, vitronectina, lactoferrina, colágenos I e IV, laminina, fibronectina e fibrinogênio foi medida. Resumidamente, placas de fundo achatado de 96 poços Maxisorp™ (Nunc, Roskilde, Dinamarca) foram revestidas por 1 hora a 37°C, seguida por uma incubação de um dia para o outro a 4°C com 2 µg/poço com mucina I, vitronectina, lactoferrina, colágenos I e IV e fibrinogênio, e com 1 µg/poço com laminina e fibronectina em solução salina tamponada com fosfato pH 7,4 (PBS). Uma placa revestida com BSA serviu como controle negativo. Os poços revestidos foram lavados 3 vezes com PBS/Tween 20™ 0,05%, e bloqueados por 2 horas a 37°C com 200 µl de BSA 1%. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS/Tween 20™ 0,05%. As amostras de proteínas (RrgA, RrgB e RrgC) foram inicialmente diluídas até 0,4 µg/µl com PBS. Duzentos µl de solução de proteína e 25 µl de preparação de fímbria (em um volume total de 200 µl com PBS) e os respectivos controles foram transferidos em placas bloqueadas revestidas nas quais as amostras foram diluídas serialmente duas vezes com PBS. As placas foram incubadas por 2 horas a 37°C e de um dia para o outro a 4°C. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS/Tween 20™ 0,05% e incubadas por 2 horas a 37°C com anticorpos primários de camundongo anti-Rrg (diluições de 1/10.000): placas revestidas com RrgA, RrgB e RrgC com anti-RrgA, anti-RrgB e anti-RrgC, respectivamente, placas revestidas com fímbrias foram incubadas com anticorpos anti-RrgB. Após mais 3 etapas de lavagem, a IgG antígeno-específica foi revelada com IgG de cabra anticamundongo conjugada à fosfatase alcalina (Sigma Chemical Co., SA Louis, Mo.) após

2 horas de incubação a 37°C.

Foi observada uma ligação significativa ao colágeno I, à lactoferrina, laminina, fibronectina e ao fibrinogênio (Fig. 13). Em todos os casos, a ligação mais forte foi observada para RrgA, seguida por RrgC e RrgB em níveis menores. As fímbrias purificadas mostraram ligação menor, mas detectável. Esse exemplo demonstra a ligação de fímbrias purificadas e proteínas isoladas das fímbrias aos componentes da matriz extracelular, e sugere uma função das fímbrias na adesão/colonização.

Exemplo 11

Fímbrias purificadas induzem respostas de citocina *in vitro*

Células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) e monócitos foram colocados em contato *in vitro* com uma preparação purificada de fímbrias e uma falsa preparação purificada de T4 que não expressa fímbrias. A produção de citocinas pelas células em resposta às fímbrias foi medida por ELISA. Fímbrias purificadas induziram a produção de citocinas inflamatórias TNF-alfa, IL-12p40 e IL-6, comparadas com o controle de fímbria delta (Fig. 14). Não foi observada indução para TLRs 2, 7, 8 e 9.

Exemplo 12

Análise por microscopia eletrônica por análise de fímbrias purificadas

Cinco microlitros da preparação de fímbrias purificadas foram colocados em uma tela de cobre de trama 300 revestida com uma fina película de carbono. As telas foram então coradas negativamente por adição de 5 microlitros de PTA 1% (ácido fosfotúngstico). O excesso de líquido foi removido.

As telas foram observadas com o uso de um microscópio eletrônico FEG200. As imagens foram registradas em uma voltagem de aceleração de 100kV e aumento nominal de 50000X sob condições de baixa dose. As fímbrias foram observadas
5 como estruturas alongadas e flexíveis (Fig. 18).

As microfotografias eletrônicas foram escaneadas, e as imagens foram então convertidas no formato IMAGIC 5 (imagic5.de). Porções idênticas de fímbrias foram escolhidas dos negativos digitalizados pela utilização de
10 caixas quadradas (300 x 300 pixels) pela utilização do software EMAN. Entre a coleção de fímbrias totalmente nas caixas, somente fímbrias lineares com alguma direção de crescimento e diâmetros similares foram processadas.

Na primeira análise, as fímbrias na caixa foram
15 invertidas em densidade, filtradas por passagem alta e passagem baixa e depois alinhadas para a projeção de um cilindro-modelo com o mesmo diâmetro (Fig. 18). O alinhamento rotacional foi aplicado com o uso da função de autocorrelação, seguida por alinhamento translacional
20 perpendicular somente ao eixo do cilindro.

O perfil de densidade através do eixo do filamento da média foi calculado, e mostrado por representação gráfica. O perfil de densidade indicou fortemente que a fímbria é uma estrutura sólida, compacta, sem orifícios no meio, e
25 que a estrutura global possui um diâmetro médio calculado de 11,5 nm (Fig. 18). Um diâmetro similar (11 nm) foi calculado a partir do volume tridimensional obtido por simetria de rotação, atribuindo-se ângulos de rotação aleatoriamente aos segmentos-haste alinhados (Fig. 19).
30 Além disso, o volume mostrou que a superfície das fímbrias

não é suave (Figs. 18-19).

Vários dos segmentos-haste pré-alinhados que apresentam fortes características estruturais de uma repetição de 13 nm foram ainda alinhados por geração de uma
5 média axial com a geração de uma imagem bidimensional aprimorada com um sinal mais forte (Fig. 20).

As imagens bidimensionais (projeções de uma estrutura tridimensional) (Figs. 21-22) mostram claramente que as fímbrias são feitas por pelo menos 3 "protofilamentos"
10 dispostos em uma estrutura *coiled-coil* com um diâmetro médio de 10,5-11,0 nm e uma inclinação de 13,2 nm (Fig. 23). O diâmetro das fímbrias na posição nodal é de 6,8 nm e cada um dos "protofilamento" possui um diâmetro de 3,5 nm (Fig. 23).

15

REFERÊNCIAS

(cada uma das quais é incorporada por referência em sua totalidade)

1. Bruyn, G. A. W. e van Furth, R. (1991) *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 10, 897- 910.
- 20 2. Ryan, M. W. e Antonelli, P.J. (2000) *Laryngoscope* 110, 961-964.
3. Cutts, F.T., Zaman, S.M., Enwere, G., Jaffar, S., Levine, O.S., Okoko, C. Oluwalana, A., Vaughan, S., Obaro, A., Leach, A., e cols. (2005) *Lancet* 365, 1.139-1.146.
- 25 4. Swiatlo, E., Champlin, F.R., Holman, S.C., Wilson, W.W. e Watt, J.M. (2002) *Infect. Immun.* 70, 412-415.
5. Sandgren, A., Albiger, B., Orihuela, C., Tuomanen, E., Normark, S. e Henriques Normark, B. (2005) *J. Infect. Dis.* 192, 791-800.
- 30 6. Henriques Normark, B., Christensson, B., Sandgren,

A., Noreen, B., Sylvan, S., Burman, L.G. e Olsson-Liljequist, B. (2003) *Microb. Drug Resist.* 9, 337-344.

7. Nunes, S., Sd-Leao, R., Carrico, J., Alves, C.R., Mato, R., Avô, A.B., Saldanha, J., Almeida, J.S., Sanches, I.S. e de Lencastre, H. (2005) *J. Clin. Microbiol.* 43, 1.285- 1.293.

8. Henrichsen, J. (1995) *J. Clin. Microbiol.* 33, 2.759-2.762.

9. Lau, G.W., Haataja, S., Lonetto, M., Kensit, S.E., Marra, A., Bryant, A.P., McDevitt, D., Morrison, D.A. e Holden, D.W. (2001) *Mol. Microbiol.* 40, 555-571.

10. Rosenow, C., Ryan, P., Weiser, J.N., Johnson, S., Fontan, P., Ortqvist, A. e Masure, H. R. (1997) *Mol. Microbiol.* 25, 819-829.

11. Tuomanen, E. (1999) *Current Opin. Biol.* 2, 35-39.

12. Ton-That, H., Marraffini, L.A. e Schneewind, O. (2004) *Mol. Microbiol.* 53, 251-261.

13. Ton-That, H. e Schneewind, O. (2003) *Mol. Microbiol.* 50, 1.429-1.438.

14. Kelstrup, J., Theilade, J. e Fejerskov, O. (1979) *Scand. J. Dent. Res.* 87, 415-423.

15. Mora, M., Bensi, G., Capo, S., Falugi, F., Zingaretti, C., Manetti, A.G.O., Maggi, T., Taddei, A.R., Grandi, G. e Telford, J.L. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 15.641-15.646.

16. Lauer, P., Rinaldo, C.D., Soriani, M., Margarit, I., Mainone, D., Rosini, R., Taddei, A.R., Mora, M., Rappuoli, R., Grandi, G. e Telford, J.L. (2005) *Science* 309, 105.

17. Li, T., Khah, M.K., Slavnic, S., Johansson, I. e

Striimberg, N. (2001) *Infect. Immun.* 69, 7.224-7.233.

18. Hava, D.L., Hemsley, C.J. e Camilli, A. (2003) *J. Bacteriol.* 185, 413-421.

19. Hava, D.L. e Camilli, A. (2002) *Mol. Microbiol.*
5 45, 1.389-1.406.

20. Schwarz-Linek, U., Hook, M. e Potts, J.R. (2004) *Mol. Microbiol.* 52, 631-641.

21. Hemsley, C., Joyce, E., Hava, D.L., Kawale, A. e Camilli, A. (2003) *J. Bacteriol.* 185, 6.640-6.647.

10 22. Sjöstriim, K., Spindler, K., Ortqvist, A., Kalin, M., Sandgren, A. e Henriques Normark, B. (2006) *Clin. Infect. Dis.*, em impressão.

23. Lau, P.C.Y., Sung, C.K., Lee, J.H., Morrison, D. A. e Cvitkovitch, G.D. (2002) *J. Microbiol. Methods* 49,
15 193-205.

24. Sung, C.K., Li, H., Claverys, J.P. e Morrison, D. A. (2001) *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5.190-5.196.

25. Bricker, A.L. e Camilli, A. (1999) *FEMS Microbiol. Lett.* 172, 131-135.

20 26. Albiger, B., Sandgren, A., Katsuragi, H., Meyer-Hoffert, U., Beiter, K., Wartha, F., Home, M., Normark, S. e Henriques Normark, B. (2005) *Cell. Microbiol.* 7, 1.603-1.615.

27. Fernebro, J., Andersson, I., Sublett, J.,
25 Morfeldt, E., Novak, R., Tuomanen, E., Normark, S. e Henriques Normark, B. (2004) *J. Infect. Dis.* 189, 328-338.

28. Gosink, K.K., Mann, E.R, Guglielmo, C., Tuomanen, E.I. e Masure, H.R. (2000) *Infect. Immun.* 68, 5.690-5.695.

29. Iannelli, F., Pearce, B.J. e Pozzi, G. (1999) *J.*
30 *Bacteriol.* 181, 2.652-2.654.

OUTRAS MODALIDADES

Diversas modalidades da invenção foram descritas. No entanto, será subentendido que podem ser feitas várias modificações, sem se afastar do espírito e escopo da invenção.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Novartis Vaccines & Diagnostics

<120> PURIFICAÇÃO DE ANTÍGENOS BACTERIANOS

<130> 20366-059W01

<150> US 60/774,450

<151> 17/02/2006

<160> 77

<170> FastSEQ para Versão Windows 4.0

<210> 1

<211> 2682

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae TIGR4

<400> 1

```

atgcttaaca gggagacaca catgaaaaaa gtaagaaaga tatttcagaa ggcagttgca 60
ggactgtgct gtatatctca gttgacagct ttttcttcga tagttgcttt agcagaaacy 120
cctgaaacca gtccagcgat aggaaaagta gtgattaagg agacaggcga aggaggagcg 180
cttctaggag atgccgtctt tgagttgaaa aacaatacgg atggcacaac tgtttcgcaa 240
aggacagagg cgcaaacagg agaagcgata ttttcaaaca taaaacctgg gacatacacc 300
ttgacagaag cccaacctcc agttggttat aaacctctca ctaaaccaatg gaotgttgaa 360
gttgagaaga atgggtcggac gactgtccaa ggtgaacagg tagaaaatcg agaagaggct 420
ctatctgacc agtatccaca aacagggact tatccagatg ttcaaacacc ttatcagatt 480
attaaggtag atgggttcgga aaaaaacgga cagcacaagg cgttgaatcc gaatccatat 540
gaacgtgtga ttccagaagg tacactttca aagagaattt atcaagtga taatttggat 600
gataaccaat atggaatcga attgacgggt agtgggaaaa cagtgtatga acaaaaagat 660
aagtctgtgc cgtctggatgt cgttatcttg ctcgataact caaatagtat gactaacatt 720
cgaaacaaga atctcgacg tgcggaagga gctggtgagg cgacacgttc tcttattgat 780
aaaattacat ctgattcaga aaatagggtg gcgcttgtga dttatgcttc cactatcttt 840
gatgggaccg agtttacagt agaaaaaggg gtagcagata aaaacggaaa gcgattgaat 900
gattctcttt tttggaatta tgatcagacg agttttacaa ccaataccaa agattatagt 960
tctttaaagc tgactaatga taagaatgac attgtagaat taaaaaataa ggtacotacc 1020
gaggcagaag accatgatgg aaatagattg atgtaccnat tcggtgcac ttttactcag 1080
aaagctttga tgaaggcaga tgagattttg acacaacaag cgagacaaaa tagtcaaaaa 1140
gtcattttcc atattacgga tgggtgtcca actatgtcgt atccgattaa ttttaatcat 1200
gctacgtttg ctccatcata tcaaaatcaa ctaaatgcat tttttagtaa atctoctaat 1260
aaagatggaa tactatttaag tgattttatt acgcaagcaa ctagtggaga acatacaatt 1320
gtacgcggag atgggcaag ttaccagatg tttacagata agacagttta tgaaaaaggt 1380
gctoctgcag ctttcccagt taaactgaa aaatattctg aaatgaaggc ggctgggttat 1440
gcagttatag gcgatccaat taatgggtga tatatttggc ttaattggag agagagtatt 1500
ctggcttata cgtttaattc taatactgct aaattacca atcatgggtga cctacaaga 1560
tggtactata acgggaatat tgctoctgat gggtatgatg tctttacggt aggtattggt 1620
attaacggag atoctgggtac ggatgaagca acggctacta gttttatgca aagtatttct 1680
agtaaacctg aaaactatac caatgttact gacacgacaa aaatattgga acagttgaat 1740
cgttatttcc acaccatagt aactgaaaay aaatcaattg agaatggtac gattacagat 1800
cogatgggtg agttaattga tttgcaattg ggcacagatg gaagatttga tccagcagat 1860
tacaacttaa ctgcacaaga tggtagtcgc ttggagaatg gacaagctgt aggtgggtcca 1920
caaaatgatg gtggtttggt aaaaaatgca aaagtgcctc atgatacgac tgagaaaagg 1980

```

```

attcgtgtaa caggctctgta ccttggaacg gatgaaaaag ttacgttgac ctacaatggt 2040
cgtttgaaatg atgagtttgt aagcaataaa ttttatgata ccaatgggtcg aacaacctta 2100
catcctaagg aagtagaaca gaacacagtg cgcgacttcc cgattcctaa gattcgtgat 2160
gtgcgggaagt atccagaaat cacaatttca aaagagaaaa aacttggtga cattgagttt 2220
attaagggtca ataaaaatga taaaaaacca ctgagagggtg cggctcttag tctcaaaaa 2280
caacatccgg attatccaga tatttatgga gctattgac aaaaatggcac ttatcaaaat 2340
gtgagaacag gtgaagatgg taagttgacc tttaaaaatc tgtcagatgg gaaatátcga 2400
ttatttgaaa attctgaacc agctgggttat aaacccgttc aaaaatagcc tatcgttgcc 2460
ttccaaatag taaatggaga agtcagagat gtgacttcaa tcgttccaca agatatacca 2520
gcgggttacg agtttacgaa tgataagcac tatattacca atgaacctat tccctcaaaag 2580
agagaatatc ctcgaaactgg tggtatcgga atgttgccat tctatctgat aggttgcag 2640
atgatgggag gagttctatt atacacacgg aaacatccgt aa 2682

```

<210> 2

<211> 893

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae TIGR4.

<400> 2

```

Met Leu Asn Arg Glu Thr His Met Lys Lys Val Arg Lys Ile Phe Gln
1      5      10      15
Lys Ala Val Ala Gly Leu Cys Cys Ile Ser Gln Leu Thr Ala Phe Ser
20     25     30
Ser Ile Val Ala Leu Ala Glu Thr Pro Glu Thr Ser Pro Ala Ile Gly
35     40     45
Lys Val Val Ile Lys Glu Thr Gly Glu Gly Gly Ala Leu Leu Gly Asp
50     55     60
Ala Val Phe Glu Leu Lys Asn Asn Thr Asp Gly Thr Thr Val Ser Gln
65     70     75     80
Arg Thr Glu Ala Gln Thr Gly Glu Ala Ile Phe Ser Asn Ile Lys Pro
85     90     95
Gly Thr Tyr Thr Leu Thr Glu Ala Gln Pro Pro Val Gly Tyr Lys Pro
100    105    110
Ser Thr Lys Gln Trp Thr Val Glu Val Glu Lys Asn Gly Arg Thr Thr
115    120    125
Val Gln Gly Glu Gln Val Glu Asn Arg Glu Glu Ala Leu Ser Asp Gln
130    135    140
Tyr Pro Gln Thr Gly Thr Tyr Pro Asp Val Gln Thr Pro Tyr Gln Ile
145    150    155    160
Ile Lys Val Asp Gly Ser Glu Lys Asn Gly Gln His Lys Ala Leu Asn
165    170    175
Pro Asn Pro Tyr Glu Arg Val Ile Pro Glu Gly Thr Leu Ser Lys Arg
180    185    190
Ile Tyr Gln Val Asn Asn Leu Asp Asp Asn Gln Tyr Gly Ile Glu Leu
195    200    205
Thr Val Ser Gly Lys Thr Val Tyr Glu Gln Lys Asp Lys Ser Val Pro
210    215    220
Leu Asp Val Val Ile Leu Leu Asp Asn Ser Asn Ser Met Ser Asn Ile
225    230    235    240
Arg Asn Lys Asn Ala Arg Arg Ala Glu Arg Ala Gly Glu Ala Thr Arg
245    250    255
Ser Leu Ile Asp Lys Ile Thr Ser Asp Ser Glu Asn Arg Val Ala Leu
260    265    270
Val Thr Tyr Ala Ser Thr Ile Phe Asp Gly Thr Glu Phe Thr Val Glu
275    280    285
Lys Gly Val Ala Asp Lys Asn Gly Lys Arg Leu Asn Asp Ser Leu Phe
290    295    300

```

Trp Asn Tyr Asp Gln Thr Ser Phe Thr Thr Asn Thr Lys Asp Tyr Ser
 305 310 315 320
 Tyr Leu Lys Leu Thr Asn Asp Lys Asn Asp Ile Val Glu Leu Lys Asn
 325 330 335
 Lys Val Pro Thr Glu Ala Glu Asp His Asp Gly Asn Arg Leu Met Tyr
 340 345 350
 Gln Phe Gly Ala Thr Phe Thr Gln Lys Ala Leu Met Lys Ala Asp Glu
 355 360 365
 Ile Leu Thr Gln Gln Ala Arg Gln Asn Ser Gln Lys Val Ile Phe His
 370 375 380
 Ile Thr Asp Gly Val Pro Thr Met Ser Tyr Pro Ile Asn Phe Asn His
 385 390 395 400
 Ala Thr Phe Ala Pro Ser Tyr Gln Asn Gln Leu Asn Ala Phe Phe Ser
 405 410 415
 Lys Ser Pro Asn Lys Asp Gly Ile Leu Leu Ser Asp Phe Ile Thr Gln
 420 425 430
 Ala Thr Ser Gly Glu His Thr Ile Val Arg Gly Asp Gly Gln Ser Tyr
 435 440 445
 Gln Met Phe Thr Asp Lys Thr Val Tyr Glu Lys Gly Ala Pro Ala Ala
 450 455 460
 Phe Pro Val Lys Pro Glu Lys Tyr Ser Glu Met Lys Ala Ala Gly Tyr
 465 470 475 480
 Ala Val Ile Gly Asp Pro Ile Asn Gly Gly Tyr Ile Trp Leu Asn Trp
 485 490 495
 Arg Glu Ser Ile Leu Ala Tyr Pro Phe Asn Ser Asn Thr Ala Lys Ile
 500 505 510
 Thr Asn His Gly Asp Pro Thr Arg Trp Tyr Tyr Asn Gly Asn Ile Ala
 515 520 525
 Pro Asp Gly Tyr Asp Val Phe Thr Val Gly Ile Gly Ile Asn Gly Asp
 530 535 540
 Pro Gly Thr Asp Glu Ala Thr Ala Thr Ser Phe Met Gln Ser Ile Ser
 545 550 555 560
 Ser Lys Pro Glu Asn Tyr Thr Asn Val Thr Asp Thr Thr Lys Ile Leu
 565 570 575
 Glu Gln Leu Asn Arg Tyr Phe His Thr Ile Val Thr Glu Lys Lys Ser
 580 585 590
 Ile Glu Asn Gly Thr Ile Thr Asp Pro Met Gly Glu Leu Ile Asp Leu
 595 600 605
 Gln Leu Gly Thr Asp Gly Arg Phe Asp Pro Ala Asp Tyr Thr Leu Thr
 610 615 620
 Ala Asn Asp Gly Ser Arg Leu Glu Asn Gly Gln Ala Val Gly Gly Pro
 625 630 635 640
 Gln Asn Asp Gly Gly Leu Leu Lys Asn Ala Lys Val Leu Tyr Asp Thr
 645 650 655
 Thr Glu Lys Arg Ile Arg Val Thr Gly Leu Tyr Leu Gly Thr Asp Glu
 660 665 670
 Lys Val Thr Leu Thr Tyr Asn Val Arg Leu Asn Asp Glu Phe Val Ser
 675 680 685
 Asn Lys Phe Tyr Asp Thr Asn Gly Arg Thr Thr Leu His Pro Lys Glu
 690 695 700
 Val Glu Gln Asn Thr Val Arg Asp Phe Pro Ile Pro Lys Ile Arg Asp
 705 710 715 720
 Val Arg Lys Tyr Pro Glu Ile Thr Ile Ser Lys Glu Lys Lys Leu Gly
 725 730 735
 Asp Ile Glu Phe Ile Lys Val Asn Lys Asn Asp Lys Lys Pro Leu Arg
 740 745 750
 Gly Ala Val Phe Ser Leu Gln Lys Gln His Pro Asp Tyr Pro Asp Ile

		755					760					765					
Tyr	Gly	Ala	Ile	Asp	Gln	Asn	Gly	Thr	Tyr	Gln	Asn	Val	Arg	Thr	Gly		
	770					775					780						
Glu	Asp	Gly	Lys	Leu	Thr	Phe	Lys	Asn	Leu	Ser	Asp	Gly	Lys	Tyr	Arg		
785					790					795					800		
Leu	Phe	Glu	Asn	Ser	Glu	Pro	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Val	Gln	Asn	Lys		
			805						810					815			
Pro.	Ile	Val	Ala	Phe	Gln	Ile	Val	Asn	Gly	Glu	Val	Arg	Asp	Val	Thr		
		820					825						830				
Ser	Ile	Val	Pro	Gln	Asp	Ile	Pro	Ala	Gly	Tyr	Glu	Phe	Thr	Asn	Asp		
	835					840						845					
Lys	His	Tyr	Ile	Thr	Asn	Glu	Pro	Ile	Pro	Pro	Lys	Arg	Glu	Tyr	Pro		
	850					855					860						
Arg	Thr	Gly	Gly	Ile	Gly	Met	Leu	Pro	Phe	Tyr	Leu	Ile	Gly	Cys	Met		
865					870					875					880		
Met	Met	Gly	Gly	Val	Leu	Leu	Tyr	Thr	Arg	Lys	His	Pro					
			885						890								

<210> 3

<211> 1998

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae TIGR4

<400> 3

atgaatcaaa	tcaacaaatt	tttaacaatg	cttgctgcct	tattactgac	agcgagtacg	60
ctgttttcag	ctgcaacagt	ttttgcggt	gggacgcagaa	caacatctgt	taccgttcat	120
aaactatttg	caacagatgg	ggatattggat	aaaattgcga	atgagttaga	aacaggttaac	180
tatgctggta	ataaactggg	tgttctacct	gcaaatgcga	aagaatttgc	cggtgttatg	240
ttcgtttgga	caaatactaa	taattgaaatt	attgatgaaa	atggccaac	tctaggagtgt	300
aatattgatc	cacaacatt	taaaacttca	ggggcaatgc	cggcaactgc	aatgaaaaaa	360
ttaacagaga	ctgaaggagc	taaaatttaac	acggcaaatc	taccagctgc	taagtataaa	420
atttatgaaa	ttcacagtgt	atcaacttat	ctcggtgaag	atggagcaac	cttaacaggt	480
tctaaagcag	ttccaattga	aattgaatta	ccattgaaag	atgtttgtgga	tgcgcattgt	540
tatccaaaaa	atacagagagc	aaagccaaaa	attgtataag	atttcaaaag	taaagcaaat	600
ccagatacac	cacgtgtaga	taagatacac	cctgtgaacc	accaagtgtg	agattgttga	660
gagtagacaa	ttgtttacaaa	atttccagca	cttgttaatt	atgcaacagc	aaactggagc	720
gatagaatga	ctgaagggtt	ggcattcaac	aaaggtacag	tgaagtaac	tgttgatgat	780
gttycatttg	aagcagggtga	ttagtctcta	acagaaagtg	caactgggtt	tgatttgaaa	840
ttaacagatg	ctggtttagc	taaaagtgaat	gaccaaaacg	ctgaaaaaac	tgtgaaaaat	900
acttattcgg	cacatttgaa	tgacaaagca	attgtagaag	taccagaatc	taatgatgtc	960
acatttaact	atggttaataa	tccagatcac	gggaatactc	caaagccgaa	taagccaaat	1020
gaaaacggcg	atttgacatt	gaccaagaca	tgggttgatg	ctacaggtgc	accaattccg	1080
gctggagctg	aaagcaacgtt	cgattttggt	aatgctcaga	ctggttaagt	tgtacaactc	1140
gttaactttga	caacagacaa	aaatacagtt	actgttaacg	gattggataa	aaatacagaa	1200
tataaattcg	ttgaacgttg	tataaaagg	tattcagcag	attatcaaga	aatcactaca	1260
gctggagaaa	ttgctgttcaa	gaactggaaa	gacgaaaatc	caaaaacoact	tgatccagca	1320
gagccaaaaa	ttgtttacata	tggtaaaaaa	tttgtcaaa	ttaatgataa	agataatcgt	1380
ttagctgggg	cagatttttgt	aattgcaaat	gctgataatg	ctggtcaata	tttagcacgt	1440
aaagcagata	aagtgaagtca	agaagagaa	cagtttggttg	ttacaacaaa	ggatgcttta	1500
gatagagcag	ttgctgctta	taacgctctt	actgcacaac	aacaaaactca	gcaagaaaaa	1560
gagaaagtgt	acaaagctca	agctgcttat	aatgctgtct	tgatttgcgc	caacaatgca	1620
tttgaattgg	ttgcagataa	ggacaattga	aatgtttgtg	aattagtttc	tgatgcacaa	1680
ggtcgctttg	aaattacagg	ccttcttgca	ggtacatatt	acttagaaga	aacaaaaacg	1740
cctgcttggt	atgcattact	aactagccgt	cagaaatttg	aagtcactgc	aacttcttat	1800
ctagcgcagt	gacaaagcat	tgagtatact	gctggtttcag	gtaaagatga	cgctcaaaaa	1860
gtagtcaaca	aaaaaatcac	tatccacaaa	acgggttggt	ttgttacaat	tatctttgct	1920

gtagcggggg ctgcgattat ggggtattgca gtgtacgcat atgttaaaaa caacaaagat 1980
gaggatcaac ttgcttaa 1998

<210> 4

<211> 665

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae TIGR4

<400> 4

Met	Lys	Ser	Ile	Asn	Lys	Phe	Leu	Thr	Met	Leu	Ala	Ala	Leu	Leu	Leu
1				5					10					15	
Thr	Ala	Ser	Ser	Leu	Phe	Ser	Ala	Ala	Thr	Val	Phe	Ala	Ala	Gly	Thr
			20					25					30		
Thr	Thr	Thr	Ser	Val	Thr	Val	His	Lys	Leu	Leu	Ala	Thr	Asp	Gly	Asp
			35				40					45			
Met	Asp	Lys	Ile	Ala	Asn	Glu	Leu	Glu	Thr	Gly	Asn	Tyr	Ala	Gly	Asn
	50					55				60					
Lys	Val	Gly	Val	Leu	Pro	Ala	Asn	Ala	Lys	Glu	Ile	Ala	Gly	Val	Met
	65				70					75				80	
Phe	Val	Trp	Thr	Asn	Thr	Asn	Asn	Glu	Ile	Ile	Asp	Glu	Asn	Gly	Gln
			85					90					95		
Thr	Leu	Gly	Val	Asn	Ile	Asp	Pro	Gln	Thr	Phe	Lys	Leu	Ser	Gly	Ala
			100					105					110		
Met	Pro	Ala	Thr	Ala	Met	Lys	Lys	Leu	Thr	Glu	Ala	Glu	Gly	Ala	Lys
		115				120						125			
Phe	Asn	Thr	Ala	Asn	Leu	Pro	Ala	Ala	Lys	Tyr	Lys	Ile	Tyr	Glu	Ile
	130					135					140				
His	Ser	Leu	Ser	Thr	Tyr	Val	Gly	Glu	Asp	Gly	Ala	Thr	Leu	Thr	Gly
	145				150					155				160	
Ser	Lys	Ala	Val	Pro	Ile	Glu	Ile	Glu	Leu	Pro	Leu	Asn	Asp	Val	Val
			165					170					175		
Asp	Ala	His	Val	Tyr	Pro	Lys	Asn	Thr	Glu	Ala	Lys	Pro	Lys	Ile	Asp
		180				185						190			
Lys	Asp	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Asn	Pro	Asp	Thr	Pro	Arg	Val	Asp	Lys
	195					200						205			
Asp	Thr	Pro	Val	Asn	His	Gln	Val	Gly	Asp	Val	Val	Glu	Tyr	Glu	Ile
	210					215					220				
Val	Thr	Lys	Ile	Pro	Ala	Leu	Ala	Asn	Tyr	Ala	Thr	Ala	Asn	Trp	Ser
	225				230					235				240	
Asp	Arg	Met	Thr	Glu	Gly	Leu	Ala	Phe	Asn	Lys	Gly	Thr	Val	Lys	Val
		245						250					255		
Thr	Val	Asp	Asp	Val	Ala	Leu	Glu	Ala	Gly	Asp	Tyr	Ala	Leu	Thr	Glu
		260					265						270		
Val	Ala	Thr	Gly	Phe	Asp	Leu	Lys	Leu	Thr	Asp	Ala	Gly	Leu	Ala	Lys
	275					280						285			
Val	Asn	Asp	Gln	Asn	Ala	Glu	Lys	Thr	Val	Lys	Ile	Thr	Tyr	Ser	Ala
	290					295					300				
Thr	Leu	Asn	Asp	Lys	Ala	Ile	Val	Glu	Val	Pro	Glu	Ser	Asn	Asp	Val
	305				310					315				320	
Thr	Phe	Asn	Tyr	Gly	Asn	Asn	Pro	Asp	His	Gly	Asn	Thr	Pro	Lys	Pro
		325						330					335		
Asn	Lys	Pro	Asn	Glu	Asn	Gly	Asp	Leu	Thr	Leu	Thr	Lys	Thr	Trp	Val
		340				345						350			
Asp	Ala	Thr	Gly	Ala	Pro	Ile	Pro	Ala	Gly	Ala	Glu	Ala	Thr	Phe	Asp
	355					360					365				
Leu	Val	Asn	Ala	Gln	Thr	Gly	Lys	Val	Val	Gln	Thr	Val	Thr	Leu	Thr
	370					375					380				

Thr Asp Lys Asn Thr Val Thr Val Asn Gly Leu Asp Lys Asn Thr Glu
 385 390 395 400
 Tyr Lys Phe Val Glu Arg Ser Ile Lys Gly Tyr Ser Ala Asp Tyr Gln
 405 410 415
 Glu Ile Thr Thr Ala Gly Glu Ile Ala Val Lys Asn Trp Lys Asp Glu
 420 425 430
 Asn Pro Lys Pro Leu Asp Pro Thr Glu Pro Lys Val Val Thr Tyr Gly
 435 440 445
 Lys Lys Phe Val Lys Val Asn Asp Lys Asp Asn Arg Leu Ala Gly Ala
 450 455 460
 Glu Phe Val Ile Ala Asn Ala Asp Asn Ala Gly Gln Tyr Leu Ala Arg
 465 470 475 480
 Lys Ala Asp Lys Val Ser Gln Glu Glu Lys Gln Leu Val Val Thr Thr
 485 490 495
 Lys Asp Ala Leu Asp Arg Ala Val Ala Ala Tyr Asn Ala Leu Thr Ala
 500 505 510
 Gln Gln Gln Thr Gln Gln Glu Lys Glu Lys Val Asp Lys Ala Gln Ala
 515 520 525
 Ala Tyr Asn Ala Ala Val Ile Ala Ala Asn Asn Ala Phe Glu Trp Val
 530 535 540
 Ala Asp Lys Asp Asn Glu Asn Val Val Lys Leu Val Ser Asp Ala Gln
 545 550 555 560
 Gly Arg Phe Glu Ile Thr Gly Leu Leu Ala Gly Thr Tyr Tyr Leu Glu
 565 570 575
 Glu Thr Lys Gln Pro Ala Gly Tyr Ala Leu Leu Thr Ser Arg Gln Lys
 580 585 590
 Phe Glu Val Thr Ala Thr Ser Tyr Ser Ala Thr Gly Gln Gly Ile Glu
 595 600 605
 Tyr Thr Ala Gly Ser Gly Lys Asp Asp Ala Thr Lys Val Val Asn Lys
 610 615 620
 Lys Ile Thr Ile Pro Gln Thr Gly Gly Ile Gly Thr Ile Ile Phe Ala
 625 630 635 640
 Val Ala Gly Ala Ala Ile Met Gly Ile Ala Val Tyr Ala Tyr Val Lys
 645 650 655
 Asn Asn Lys Asp Glu Asp Gln Leu Ala
 660 665

<210> 5

<211> 1182

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae TIGR4

<400> 5

atgattagtc gtatcttctt tggtatggct ctgtgttttt ctcttgatg ggggcacat 60
 gcagtcacag cgcaagaaga tcacacgttg gtcttgcaat tggagaacta tcaggagggtg 120
 gttagtcaat tgccatctcg tgatgggtcat cgggttgcaag tatggaagtt ggatgattcg 180
 tattcctatg atgatcgggt gcaaattgta agagacttgc attcgtggga tgagaataaa 240
 ctttcttctt tcaaaaagac ttcgtttgag atgaccttcc ttgagaatca gattgsagta 300
 tctcatatcc caastggtct ttactatggt cgtcttatta tccagacgga tgcggtttct 360
 tatccagctg aatttctttt tgaaatgaca gatcaaacgg tagagccttt ggtcattgta 420
 gcgaaaaaaa cagatacaat gacaacaaag gtgaagctga taagggtgga tcaagaccac 480
 aatcgcttgg aggggtgtcg ctttaaatg gtatcagtag caagagatgt ttctgaaaaa 540
 gaggttccct tgattggaga ataccgttac agttcttctg gtcaagtagg gagaactctc 600
 tatactgata aaaatggaga gatttttctg acaaatcttc ctcttgggaa ctatcgtttc 660
 aaggaggtgg agccactggc aggtatgct gttacgacgc tggatacggg tgtccagctg 720
 gtatgatcac agctgggtgac gattacggtt gtcaatcaga aattaccacg tggcaatgtt 780

```

gactttatga aggtggatgg tgggaccaat acctctcttc aaggggcaat gttcaaagtc 840
atgaagaag aaagcggaca ctatactcct gttcttcaaa atggtaagga agtagttgta 900
acatcaggga aagatgggtcg tttccgagtg gaaggtctag agtatgggac atactattta 960
tgggagctcc aagctccaac tggttatggt caattaacat cgcctgttcc ctttacaatc 1020
gggaagata ctcgtaagga actggtaaca gtggttaaaa ataacaagcg accacggatt 1080
gatgtgccag atacagggga agaaccttg tatatcttga tgcttggtgc cattttgttg 1140
tttggtagtg gttattatct tacgaaaaaa ccaataaact ga 1182

```

<210> 6

<211> 393

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae TIGR4

<400> 6

```

Met Ile Ser Arg Ile Phe Phe Val Met Ala Leu Cys Phe Ser Leu Val
1      5      10      15
Trp Gly Ala His Ala Val Gln Ala Gln Glu Asp His Thr Leu Val Leu
20     25     30
Gln Leu Glu Asn Tyr Gln Glu Val Val Ser Gln Leu Pro Ser Arg Asp
35     40     45
Gly His Arg Leu Gln Val Trp Lys Leu Asp Asp Ser Tyr Ser Tyr Asp
50     55     60
Asp Arg Val Gln Ile Val Arg Asp Leu His Ser Trp Asp Glu Asn Lys
65     70     75     80
Leu Ser Ser Phe Lys Lys Thr Ser Phe Glu Met Thr Phe Leu Glu Asn
85     90     95
Gln Ile Glu Val Ser His Ile Pro Asn Gly Leu Tyr Tyr Val Arg Ser
100    105    110
Ile Ile Gln Thr Asp Ala Val Ser Tyr Pro Ala Glu Phe Leu Phe Glu
115    120    125
Met Thr Asp Gln Thr Val Glu Pro Leu Val Ile Val Ala Lys Lys Thr
130    135    140
Asp Thr Met Thr Thr Lys Val Lys Leu Ile Lys Val Asp Gln Asp His
145    150    155    160
Asn Arg Leu Glu Gly Val Gly Phe Lys Leu Val Ser Val Ala Arg Asp
165    170    175
Val Ser Glu Lys Glu Val Pro Leu Ile Gly Glu Tyr Arg Tyr Ser Ser
180    185    190
Ser Gly Gln Val Gly Arg Thr Leu Tyr Thr Asp Lys Asn Gly Glu Ile
195    200    205
Phe Val Thr Asn Leu Pro Leu Gly Asn Tyr Arg Phe Lys Glu Val Glu
210    215    220
Pro Leu Ala Gly Tyr Ala Val Thr Thr Leu Asp Thr Asp Val Gln Leu
225    230    235    240
Val Asp His Gln Leu Val Thr Ile Thr Val Val Asn Gln Lys Leu Pro
245    250    255
Arg Gly Asn Val Asp Phe Met Lys Val Asp Gly Arg Thr Asn Thr Ser
260    265    270
Leu Gln Gly Ala Met Phe Lys Val Met Lys Glu Glu Ser Gly His Tyr
275    280    285
Thr Pro Val Leu Gln Asn Gly Lys Glu Val Val Val Thr Ser Gly Lys
290    295    300
Asp Gly Arg Phe Arg Val Glu Gly Leu Glu Tyr Gly Thr Tyr Tyr Leu
305    310    315    320
Trp Glu Leu Gln Ala Pro Thr Gly Tyr Val Gln Leu Thr Ser Pro Val
325    330    335
Ser Phe Thr Ile Gly Lys Asp Thr Arg Lys Glu Leu Val Thr Val Val

```

```

          340          345          350
Lys Asn Asn Lys Arg Pro Arg Ile Asp Val Pro Asp Thr Gly Glu Glu
          355          360          365
Thr Leu Tyr Ile Leu Met Leu Val Ala Ile Leu Leu Phe Gly Ser Gly
          370          375          380
Tyr Tyr Leu Thr Lys Lys Pro Asn Asn
          385          390

```

```

<210> 7
<211> 20
<212> PRT
<213> Streptococcus pneumoniae TIGR4

```

```

<400> 7
Leu Ala Gly Ala Glu Phe Val Ile Ala Asn Ala Asp Asn Ala Gly Gln
  1          5          10          15
Tyr Leu Ala Arg
          20

```

```

<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

```

```

<220>
<223> Peptídeo gerado sinteticamente

```

```

<220>
<221> VARIANTE
<222> 3
<223> Xaa = Aminoácido não definido

```

```

<400> 8
Tyr Pro Xaa Thr Gly
  1          5

```

```

<210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

```

```

<220>
<223> Peptídeo gerado sinteticamente

```

```

<220>
<221> VARIANTE
<222> 3
<223> Xaa = Aminoácido qualquer

```

```

<400> 9
Ile Pro Xaa Thr Gly
  1          5

```

<210> 10
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Peptídeo gerado sinteticamente

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 3
 <223> Xaa = Aminoácido qualquer

<400> 10
 Val Pro Xaa Thr Gly
 1 5

<210> 11
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Peptídeo gerado sinteticamente

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 3
 <223> Xaa = Aminoácido qualquer

<400> 11
 Leu Pro Xaa Thr Gly
 1 5

<210> 12
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Peptídeo gerado sinteticamente

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 3
 <223> Xaa = Aminoácido não definido

<400> 12
 Val Val Xaa Thr Gly
 1 5

<210> 13
 <211> 5
 <212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Peptídeo gerado sinteticamente

<220>

<221> VARIANTE

<222> 3

<223> Xaa = Aminoácido qualquer

<400> 13

Glu Val Xaa Thr Gly
1 5

<210> 14

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Peptídeo gerado sinteticamente

<220>

<221> VARIANTE

<222> 3

<223> Xaa = Aminoácido qualquer

<400> 14

Gln Val Xaa Thr Gly
1 5

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Peptídeo gerado sinteticamente

<220>

<221> VARIANTE

<222> 3

<223> Xaa = Aminoácido qualquer

<400> 15

Leu Pro Xaa Ala Gly
1 5

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Peptídeo gerado sinteticamente

<400> 16
Gln Val Pro Thr Gly
1 5

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Peptídeo gerado sinteticamente

<220>

<221> VARIANTE

<222> 3

<223> Xaa = any amino acid

<400> 17
Phe Pro Xaa Thr Gly
1 5

<210> 18

<211> 32

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 18
tttttgggccc ettctgtgttc gtgctgactt gc 32

<210> 19

<211> 33

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 19
tttttgggacc cgatgttgct gattaagacg agc 33

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 20
aacttttttt acgtttccgc c 21

<210> 21
<211> 19
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador

<400> 21
accgaaagac agacgagcc

19

<210> 22
<211> 32
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador

<400> 22
ttggatccct tttaatactg tagaaaagag ga

32

<210> 23
<211> 31
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador

<400> 23
ttgggccta aaacaattca tccagtataa t

31

<210> 24
<211> 33
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador

<400> 24
tctatgccta ttccagagga aatggatcgg atc

33

<210> 25
<211> 28
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador

<400> 25
ctagggcct ttccttatgc ttttggac

28

<210> 26

<211> 22
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador

<400> 26
aggagacatt ccttccgtat ct

22

<210> 27
<211> 20
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador

<400> 27
caagagcaca gcgtggtgct

20

<210> 28
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador

<400> 28
caaggtccaa acctactgaa c

21

<210> 29
<211> 29
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador

<400> 29
gcggggcccct gagatataca gcacagtc

29

<210> 30
<211> 29
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador

<400> 30
cgggatccct ggcatttctg ggaatcctg

29

<210> 31
<211> 23
<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 31

cgtttcaagt gctatcactg ttc

23

<210> 32

<211> 26

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 32

atataacatg aacagttggg ttcttg

26

<210> 33

<211> 33

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 33

atatagggcc caacctcttg caattatacc aca

33

<210> 34

<211> 32

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 34

atataggatc ccgcgtttga actgtacctc aa

32

<210> 35

<211> 27

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 35

atatacagta actgtctcat ccaaatac

27

<210> 36

<211> 29

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 36

atatactgct tcaatccatt agttatttc

29

<210> 37

<211> 30

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 37

atatattgat tgtaaaaatt ccatctatag

30

<210> 38

<211> 30

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 38

ttggatcctt atttcctcgt tagtaaagct

30

<210> 39

<211> 32

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 39

ttgggcccaa agaaatgaaa ggaaagctaa gg

32

<210> 40

<211> 21

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 40

caaggtccaa acctactgaa c

21

<210> 41

<211> 29

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 41
gcgggcccct gagatataca gcacagtcc

29

<210> 42
<211> 29
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador

<400> 42
cgggatccct ggcatttctg ggaatcctg

29

<210> 43
<211> 23
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador

<400> 43
cgtttcaagt gctatcactg ttc

23

<210> 44
<211> 22
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador

<400> 44
gccccatctt gccctcactg cg

22

<210> 45
<211> 26
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador

<400> 45
atataacatg aacagttggg ttcttg

26

<210> 46
<211> 33
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador

<400> 46

atatagggcc caacetottg caattatacc aca

33

<210> 47
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 47
 atataggatc ccgcgtttga actgtacctc aa

32

<210> 48
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 48
 atatacagta actgtctcat ccaaate

27

<210> 49
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 49
 atatactgct tcaatccatt agttatttc

29

<210> 50
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 50
 atatattgat tgtaaaaatt ccatttatag

30

<210> 51
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 51
 cgcggatcca aaggagaatc atcatgctaa acaaatatcat tga

43

<210> 52
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 52
 ccctctagat.tataacaaat agtgagcctt

30

<210> 53
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Peptídeo gerado sinteticamente

<400> 53
 Gly Ser.Gly Gly Gly Gly
 1 5

<210> 54
 <211> 6
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Padrão de Exemplo

<400> 54
 gtcgtt

6

<210> 55
 <211> 6
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Padrão de Exemplo

<400> 55
 ttcggt

6

<210> 56
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Peptídeo gerado sinteticamente

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 12

<223> Xaa = Aminoácido qualquer

<400> 56

Ala Gly Thr Thr Thr Ser Val Thr Val His Xaa Leu
1 5 10

<210> 57

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Peptídeo gerado sinteticamente

<220>

<221> VARIANTE

<222> 3

<223> Xaa = Aminoácido qualquer

<400> 57

Leu Pro Xaa Ser Gly
1 5

<210> 58

<211> 19

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Peptídeo gerado sinteticamente

<220>

<221> VARIANTE

<222> 13, 14, 15, 16, 17, 18

<223> Xaa = Aminoácido qualquer

<400> 58

Trp Leu Gln Asp Val His Val Tyr Pro Lys His Gln Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15
Xaa Xaa Lys

<210> 59

<211> 19

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Peptídeo gerado sinteticamente

<220>

<221> VARIANTE

<222> 13, 14, 15, 16, 17, 18

<223> Xaa = Aminoácido qualquer

<400> 59
 Trp Asn Tyr Asn Val Val Ala Tyr Pro Lys Asn Thr Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Lys

<210> 60
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Peptídeo gerado sinteticamente

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 13, 14, 15, 16, 17, 18
 <223> Xaa = Aminoácido qualquer

<400> 60
 Trp Leu Tyr Asp Val Asn Val Phe Pro Lys Asn Gly Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Lys

<210> 61
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Peptídeo gerado sinteticamente

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 13, 14, 15, 16, 17, 18
 <223> Xaa = Aminoácido qualquer

<400> 61
 Trp Ile Tyr Asp Val His Val Tyr Pro Lys Asn Glu Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Lys

<210> 62
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Peptídeo gerado sinteticamente

<220>

<221> VARIANTE
 <222> 13, 14, 15, 16, 17, 18
 <223> Xaa = Aminoácido qualquer

<400> 62
 Trp Asn Tyr Asn Val His Val Tyr Pro Lys Asn Thr Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Lys

<210> 63
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Peptídeo gerado sinteticamente

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 13, 14, 15, 16, 17, 18
 <223> Xaa = Aminoácido qualquer

<400> 63
 Phe Leu Ser Glu Ile Asn Ile Tyr Pro Lys Asn Val Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Lys

<210> 64
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Peptídeo gerado sinteticamente

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 13, 14, 15, 16, 17, 18
 <223> Xaa = Aminoácido qualquer

<400> 64
 Asp Val Val Asp Ala His Val Tyr Pro Lys Asn Thr Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Lys

<210> 65
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência consenso

<220>

<221> VARIANTE

<222> 1

<223> Xaa = Trp, Phe, Glu ou Asp

<220>

<221> VARIANTE

<222> 5, 7

<223> Xaa = Val, Ile, Ala

<220>

<221> VARIANTE

<222> 8

<223> Xaa = Tyr ou Phe

<220>

<221> VARIANTE

<222> 11

<223> Xaa = Asn, His ou Asp

<220>

<221> VARIANTE

<222> 2, 3, 4, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18

<223> Xaa = aminoácido qualquer

<220>

<221> VARIANTE

<222> 19

<223> Xaa = Lys ou Leu

<400> 65

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Pro	Lys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
1				5					10					15	
Xaa Xaa Xaa															

<210> 66

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Peptídeo gerado sinteticamente

<400> 66

Phe	Cys	Leu	Val	Glu	Thr	Ala	Thr	Ala	Ser	Gly	Tyr
1				5					10		

<210> 67

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Peptídeo gerado sinteticamente

<400> 67

Phe Cys Leu Lys Glu Thr Lys Ala Pro Ala Gly Tyr
 1 5 10

<210> 68

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Peptídeo gerado sinteticamente

<400> 68

Tyr Val Leu Val Glu Thr Glu Ala Pro Thr Gly Phe
 1 5 10

<210> 69

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Peptídeo gerado sinteticamente

<400> 69

Tyr Cys Leu Val Glu Thr Lys Ala Pro Tyr Gly Tyr
 1 5 10

<210> 70

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Peptídeo gerado sinteticamente

<400> 70

Tyr Lys Leu Lys Glu Thr Lys Ala Pro Tyr Gly Tyr
 1 5 10

<210> 71

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Peptídeo gerado sinteticamente

<400> 71

Tyr Pro Ile Thr Glu Glu Val Ala Pro Ser Gly Tyr

1 5 10

<210> 72
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Peptídeo gerado sinteticamente

<400> 72
 Tyr Arg Leu Phe Glu Asn Ser Glu Pro Ala Gly Tyr
 1 5 10

<210> 73
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Peptídeo gerado sinteticamente

<400> 73
 Tyr Tyr Leu Trp Glu Leu Gln Ala Pro Thr Gly Tyr
 1 5 10

<210> 74
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Peptídeo gerado sinteticamente

<400> 74
 Tyr Tyr Leu Glu Glu Thr Lys Gln Pro Ala Gly Tyr
 1 5 10

<210> 75
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Sequência consenso

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 1, 12
 <223> Xaa = Tyr ou Phe

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 3

<223> Xaa = Leu ou Ile

<220>

<221> VARIANTE

<222> 8

<223> Xaa = Ala, Gln or Thr

<220>

<221> VARIANTE

<222> 9

<223> Xaa = Pro ou Ala

<220>

<221> VARIANTE

<222> 2, 4, 7, 10

<223> Xaa = Aminoácido qualquer

<400> 75

Xaa Xaa Xaa Xaa Glu Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa
1 5 10

<210> 76

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Peptídeo gerado sinteticamente

<220>

<221> VARIANTE

<222> 2, 3, 4, 6

<223> Xaa = Aminoácido qualquer

<400> 76

Trp Xaa Xaa Xaa Val Xaa Val Tyr Pro Lys
1 5 10

<210> 77

<211> 4

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Peptídeo gerado sinteticamente

<220>

<221> VARIANTE

<222> 2

<223> Xaa = Aminoácido qualquer

<400> 77

Leu Xaa Glu Thr
1

REIVINDICAÇÕES

1. Fímbria estreptocócica isolada caracterizada pelo fato de que é: uma fímbria de *Streptococcus pneumoniae*; uma fímbria de *Streptococcus pyogenes*; ou uma fímbria de *Streptococcus agalactiae*.

2. Fímbria, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que é uma fímbria de *Streptococcus pneumoniae* que compreende uma proteína RrgB.

3. Fímbria, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de possuir um peso molecular de 2×10^6 a 3×10^6 Da.

4. Fímbria, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de ter sido separada de células por digestão enzimática ou cisalhamento mecânico.

5. Fímbria, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que o cisalhamento mecânico compreende ultrassonificação.

6. Fímbria, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4 ou 5, caracterizada por ser substancialmente livre de células bacterianas.

7. Fímbria, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5 ou 6, caracterizada pelo fato de que a fímbria compreende três protofilamentos.

8. Composição imunogênica caracterizada por compreender uma ou mais fímbrias de qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7.

9. Método de produção da fímbria de qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 caracterizado por compreender a submissão de uma célula bacteriana que produz a fímbria à digestão enzimática ou ao cisalhamento

3 mecânico, e o isolamento da fímbria da célula.

10. Método de isolamento de fímbrias de *Streptococcus pneumoniae* caracterizado por compreender:

5 - a submissão das células bacterianas que produzem fímbrias de *Streptococcus pneumoniae* à digestão enzimática ou ao cisalhamento mecânico; e

- o isolamento das fímbrias das células.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que as células bacterianas são
10 células de *Streptococcus pneumoniae* (por exemplo, células TIGR4), em que as células são submetidas à ultrassonificação ou à digestão com uma enzima lítica, e em que os componentes não celulares são separados após a ultrassonificação ou a digestão, mas antes da etapa de
15 isolamento.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que ainda compreende a degradação de ácidos nucleicos com uma nuclease.

13. Método, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o cisalhamento mecânico
20 compreende ultrassonificação.

14. Método, de acordo com a reivindicação 10 ou 11, caracterizado pelo fato de que a digestão enzimática é realizada com o uso de mutanolisina.

15. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10, 11, 12, 13 ou 14, caracterizado pelo fato de que o isolamento compreende uma ou mais centrifugações por gradiente de densidade ou etapas de cromatografia.

30 16. Método, de acordo com a reivindicação 11,

caracterizado pelo fato de que os componentes não celulares são separados com o uso de centrifugação por gradiente de densidade.

17. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10, 11, 12, 13 ou 14, caracterizado pelo fato de que a etapa do isolamento compreende a redução da polidispersibilidade.

18. Método, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que a polidispersibilidade é reduzida por separação das fímbrias de *Streptococcus pneumoniae* por tamanho usando cromatografia por filtração em gel.

19. Anticorpo que se liga especificamente a uma fímbria de *Streptococcus pneumoniae* caracterizado pelo fato de que o anticorpo preferencialmente (i) se liga a um complexo de fímbrias, como comparada com a ligação do anticorpo a uma proteína da fímbria que não esteja em complexo, selecionada do grupo que consiste em RrgA, RrgB e RrgC, ou (ii) não se liga especificamente à RrgA, RrgB ou RrgC que não esteja em complexo.

20. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é selecionado do grupo que consiste em um anticorpo monoclonal, um anticorpo policlonal, um anticorpo quimérico, um anticorpo humano, um anticorpo humanizado, um anticorpo de cadeia simples ou um fragmento Fab.

21. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 19 ou 20, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é marcado.

22. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que o marcador é uma enzima, um

radioisótopo, agente de contraste, uma toxina ou um fluoróforo.

23. Método de indução de uma resposta imunológica contra *Streptococcus pneumoniae* caracterizado por
5 compreender a administração de uma quantidade eficaz de fímbrias isoladas de *Streptococcus pneumoniae* a um indivíduo.

24. Método, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que o indivíduo é um ser humano.

10 25. Método de detecção de uma infecção bacteriana gram-positiva em um indivíduo caracterizado por compreender o teste de uma amostra do indivíduo quanto à presença de um anticorpo para fímbrias bacterianas gram-positivas, em que o anticorpo se liga preferencialmente a um complexo de
15 fímbrias, comparado com um componente das fímbrias.

26. Método de detecção de uma infecção por *Streptococcus pneumoniae* em um indivíduo caracterizado por compreender o teste de uma amostra do indivíduo quanto à presença de um anticorpo para fímbrias de *Streptococcus*
20 *pneumoniae*, em que o anticorpo se liga preferencialmente a um complexo de fímbrias, comparado com um componente de fímbrias.

27. Método, de acordo com a reivindicação 25 ou 26, caracterizado pelo fato de que a amostra é soro.

25 28. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 25, 26 ou 27, caracterizado pelo fato de que o indivíduo é um ser humano.

29. Método de detecção de uma infecção por *Streptococcus pneumoniae* em um indivíduo caracterizado por
30 compreender contatar uma amostra com um anticorpo de

qualquer uma das reivindicações 19, 20, 21 ou 22 e a detecção da ligação do anticorpo com um componente da amostra.

30. Método de tratamento de um indivíduo que possui
5 uma infecção por *Streptococcus pneumoniae* caracterizado por compreender a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um agente que se liga especificamente às fímbrias de *Streptococcus pneumoniae*.

31. Método, de acordo com a reivindicação 30,
10 caracterizado pelo fato de que o agente é um anticorpo.

32. Método, de acordo com a reivindicação 31,
caracterizado pelo fato de que o anticorpo bloqueia adesão do *Streptococcus pneumoniae* às células.

33. Método, de acordo com a reivindicação 32,
15 caracterizado pelo fato de que as células são células epiteliais.

34. Método, de acordo com a reivindicação 33,
caracterizado pelo fato de que as células epiteliais são células epiteliais do pulmão ou da nasofaringe.

20 35. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 31, 32, 33 ou 34, caracterizado pelo fato de que o anticorpo (i) se liga preferencialmente a um complexo de fímbrias, comparada com a ligação do anticorpo a uma proteína da fímbria que não esteja em complexo selecionada
25 do grupo que consiste em RrgA, RrgB e RrgC, ou (ii) não se liga especificamente à RrgA, RrgB ou RrgC que não esteja em complexo.

36. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 31, 32, 33, 34 ou 35, caracterizado pelo
30 fato de que o anticorpo bloqueia pelo menos 50% da adesão

de *Streptococcus pneumoniae* à célula, medida em um ensaio que mede a adesão de *Streptococcus pneumoniae* às células epiteliais pulmonares A549, comparado com um controle.

37. Método, de acordo com qualquer uma das
5 reivindicações 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36, caracterizado pelo fato de que o indivíduo é um ser humano.

38. Fímbria isolada ou multímero semelhante a fímbria caracterizada pelo fato de compreender um polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácidos de uma proteína de
10 fímbria de *Streptococcus pneumoniae* com até 30 substituições, inserções ou deleções de aminoácidos.

39. Fímbria ou multímero semelhante a fímbria, de acordo com a reivindicação 38, caracterizada por ter: (i) até 20 substituições, inserções ou deleções de aminoácidos;
15 (ii) até 10 substituições, inserções ou deleções de aminoácidos; ou (iii) até 5 substituições, inserções ou deleções de aminoácidos.

40. Fímbria ou multímero semelhante a fímbria, de acordo com a reivindicação 38 ou 39, caracterizada pelo
20 fato de que as substituições, inserções ou deleções de aminoácidos são substituições de aminoácidos.

41. Fímbria ou multímero semelhante a fímbria, de acordo com a reivindicação 40, caracterizada pelo fato de que as substituições de aminoácidos são substituições
25 conservativas de aminoácidos.

42. Fímbria ou multímero semelhante a fímbria, de acordo com qualquer uma das reivindicações 38, 39, 40 ou 41, caracterizada pelo fato de que a proteína é RrgA, RrgB ou RrgC.

30 43. Método de purificação de *Streptococcus pneumoniae*

de uma amostra compreendendo *Streptococcus pneumoniae* caracterizado por compreender:

a) o fornecimento de uma matriz de afinidade que compreende o anticorpo de qualquer uma das reivindicações
5 14, 15, 16 ou 17 ligado a um suporte sólido;

b) o contato da amostra com a matriz de afinidade para formar um complexo matriz de afinidade-*Streptococcus pneumoniae*;

c) a separação do complexo matriz de afinidade-
10 *Streptococcus pneumoniae* do restante da amostra; e

d) a liberação do *Streptococcus pneumoniae* da matriz de afinidade.

44. Método de identificação de um modulador de uma atividade de *Streptococcus pneumoniae* caracterizado por
15 compreender: (i) o contato de uma célula suscetível à infecção por *Streptococcus pneumoniae* com um composto candidato e *Streptococcus pneumoniae*, e a determinação de se uma atividade de *Streptococcus pneumoniae* é inibida, em que a inibição da atividade de *Streptococcus pneumoniae* é
20 indicativa de um inibidor de *Streptococcus pneumoniae*, ou (ii) o contato de uma célula animal suscetível à ligação das fímbrias de *Streptococcus pneumoniae* com um composto candidato e uma célula bacteriana que possui fímbrias de *Streptococcus pneumoniae*, e a determinação de se a ligação
25 da célula bacteriana à célula animal é inibida, em que a inibição da atividade de ligação é indicativa de um inibidor da ligação de fímbrias de *Streptococcus pneumoniae*, ou (iii) o contato de uma célula suscetível à ligação de fímbrias de *Streptococcus pneumoniae* com um
30 composto candidato e fímbrias de *Streptococcus pneumoniae*,

e a determinação de se a ligação das fímbrias à célula é inibida, em que a inibição da atividade de ligação é indicativa de um inibidor da ligação de fímbrias de *Streptococcus pneumoniae*, ou (iv) o contato de uma célula
5 suscetível à ligação de fímbrias de *Streptococcus pneumoniae* com um composto candidato e uma proteína de fímbria de *Streptococcus pneumoniae* ou fragmento de ligação celular desta, e a determinação de se a ligação da proteína de fímbria ou de fragmento desta à célula é inibida, em que
10 a inibição da atividade de ligação é indicativa de um inibidor da ligação de fímbrias de *Streptococcus pneumoniae*.

45. Método, de acordo com a reivindicação 44, caracterizado pelo fato de que a atividade de *Streptococcus pneumoniae* é a adesão de *Streptococcus pneumoniae* às
15 células epiteliais pulmonares A549.

46. Método, de acordo com a reivindicação 44 ou 45, caracterizado pelo fato de que a célula suscetível é isolada ou cultivada.

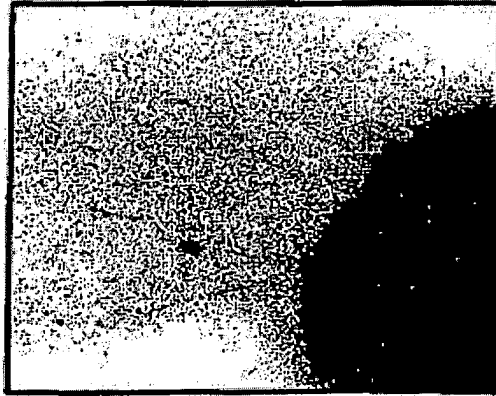


FIG. 1A

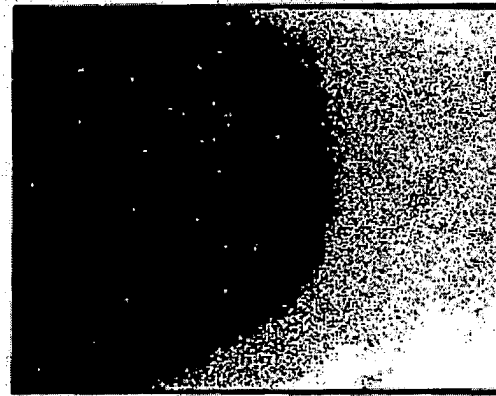


FIG. 1B

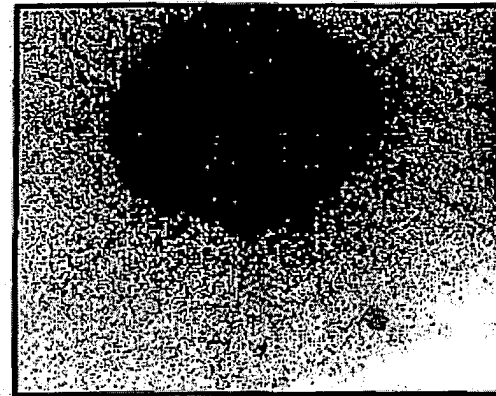


FIG. 1C

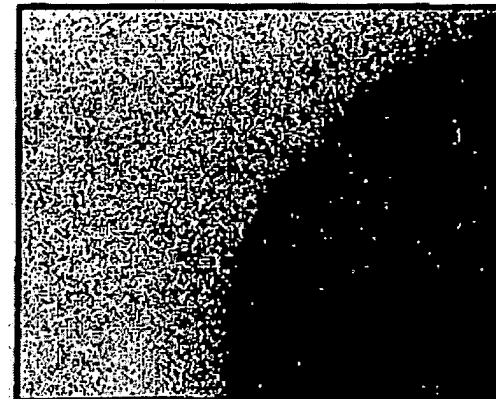


FIG. 1D

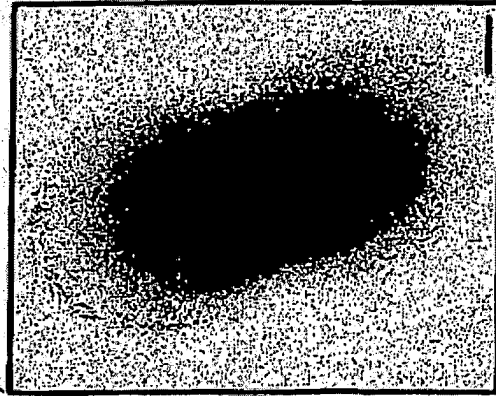


FIG. 1E

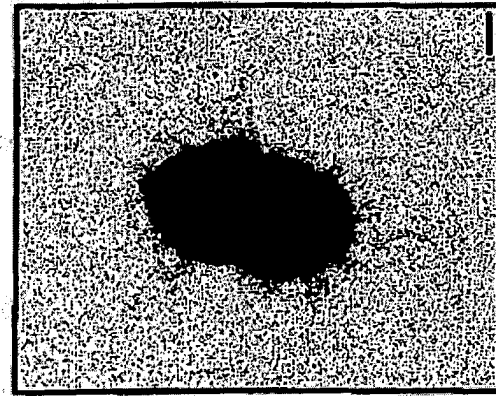


FIG. 1F

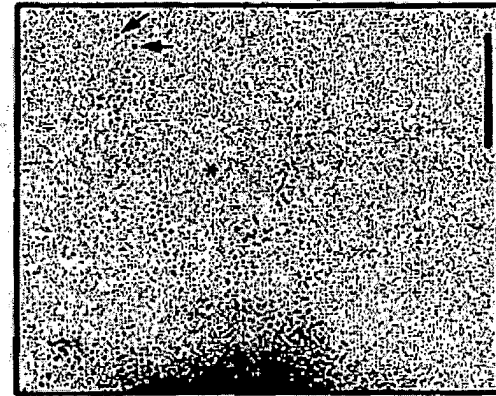


FIG. 1G

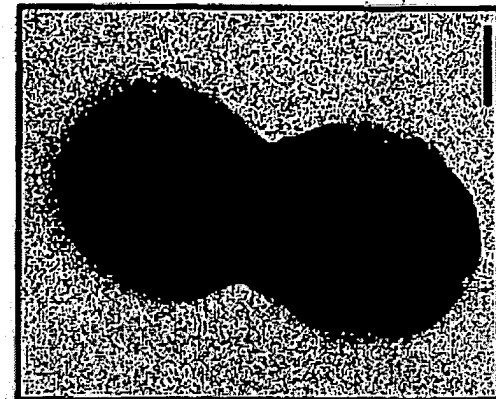


FIG. 1H

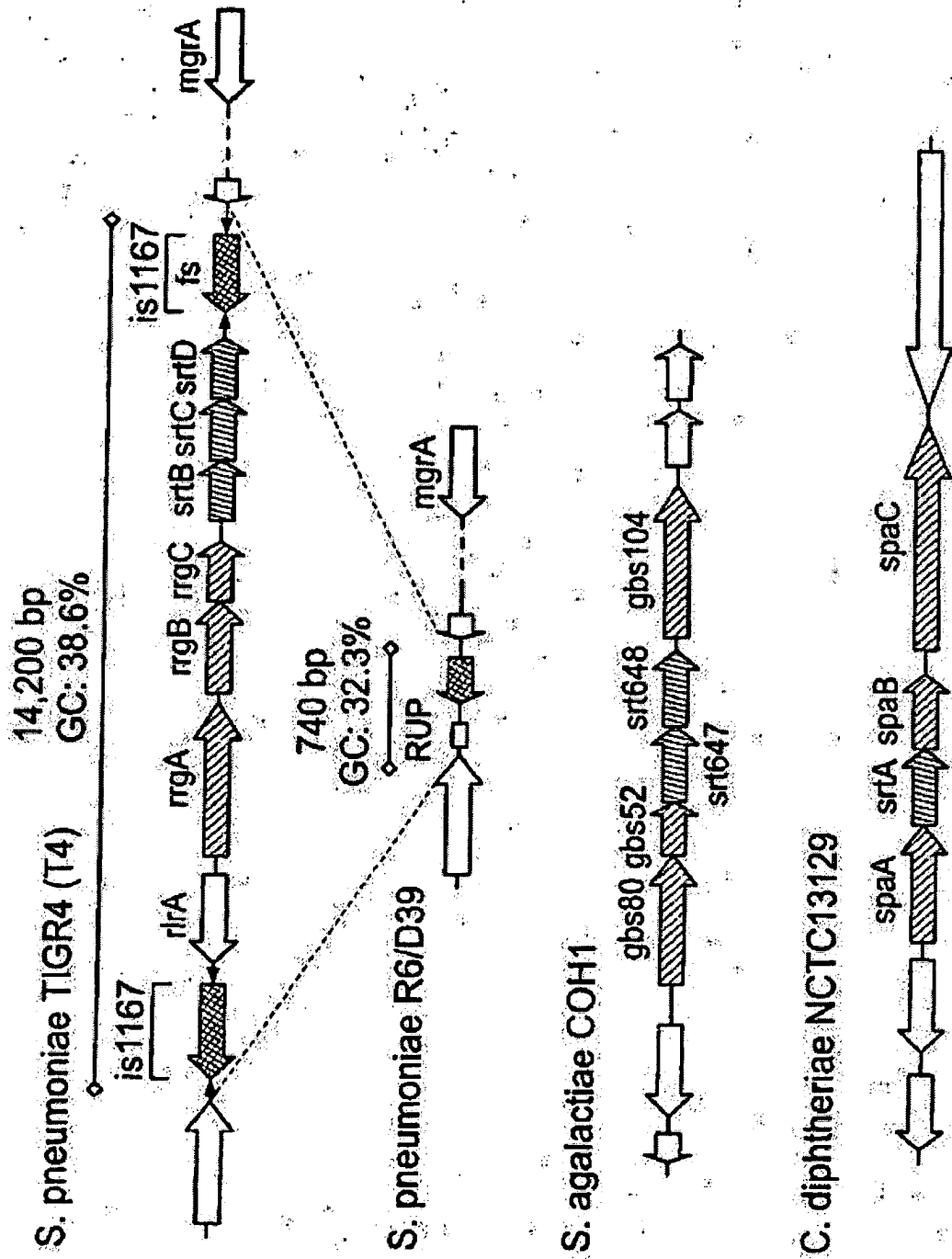


FIG. 2

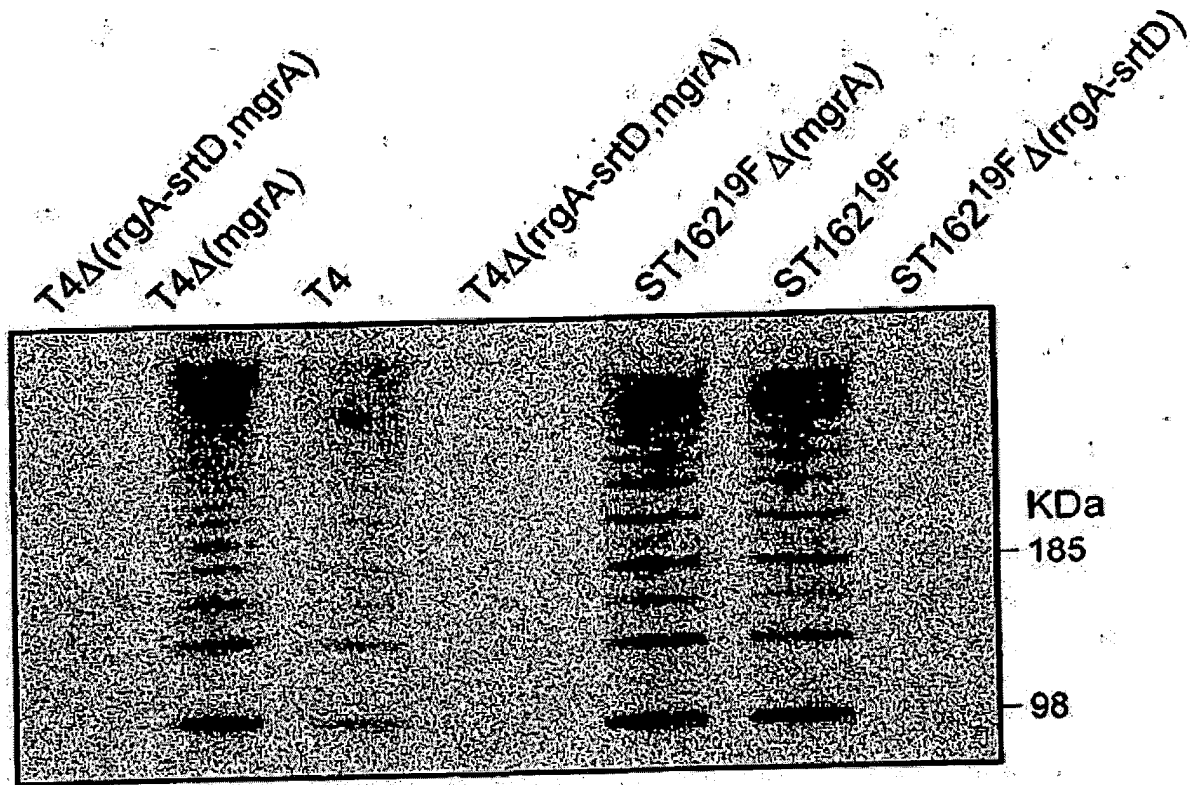


FIG. 3A

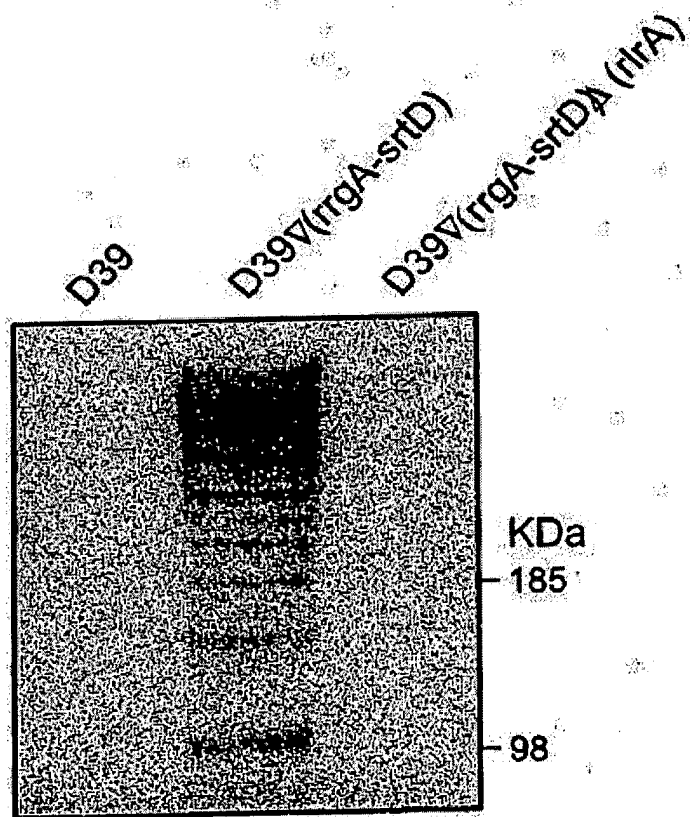


FIG. 3B

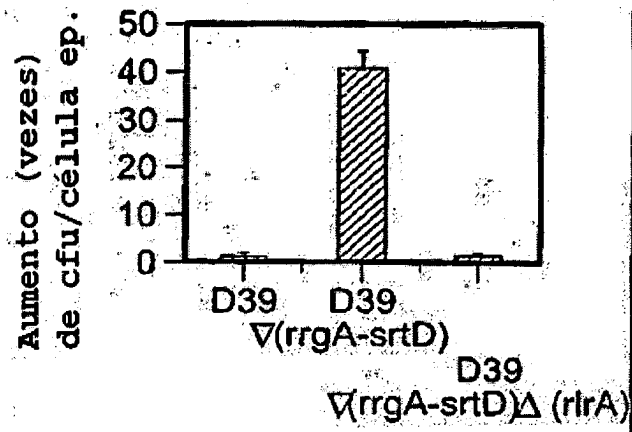


FIG. 4A



FIG. 4B



FIG. 4C



FIG. 4D

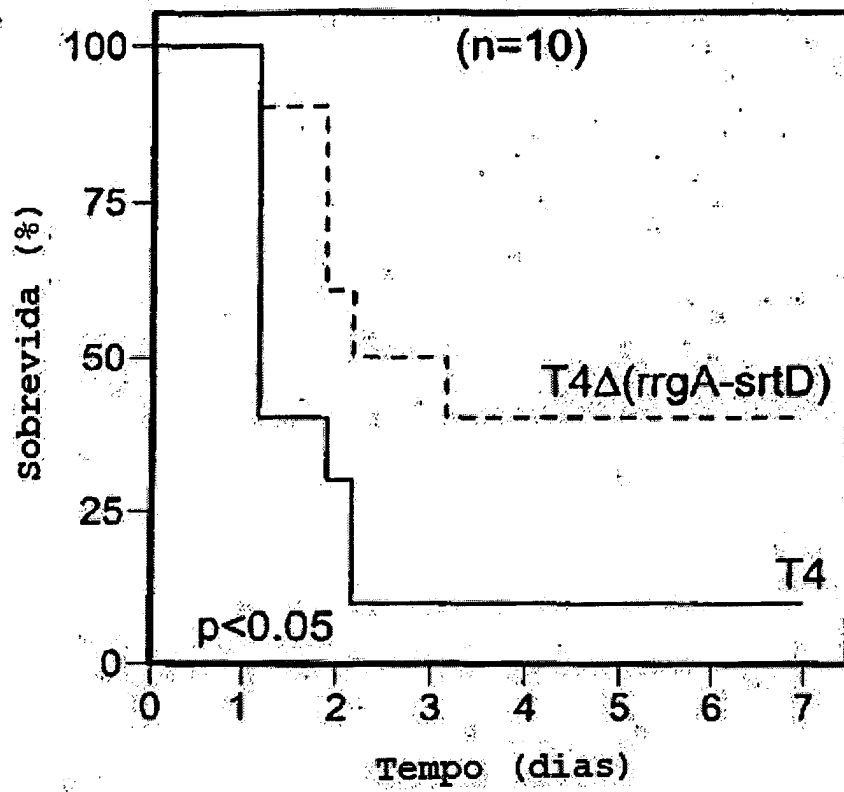


FIG. 5A

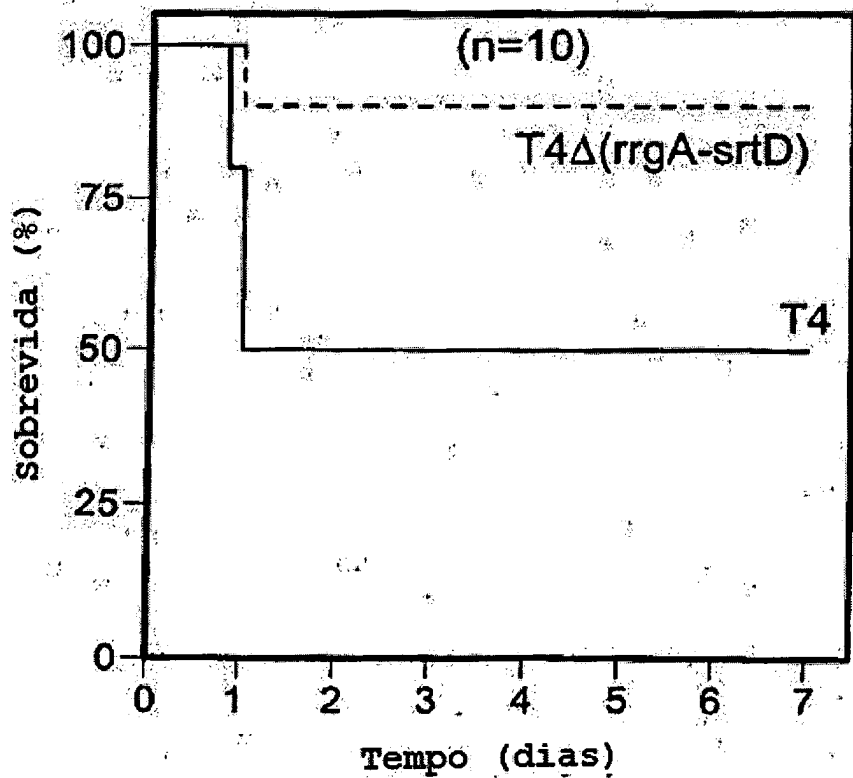


FIG. 5B

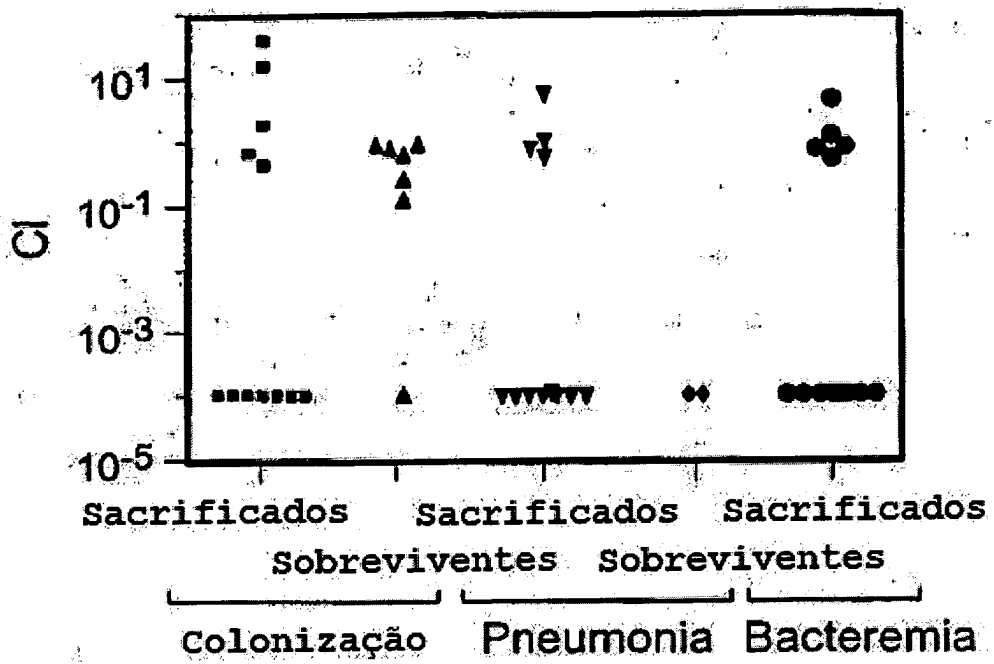


FIG. 5C

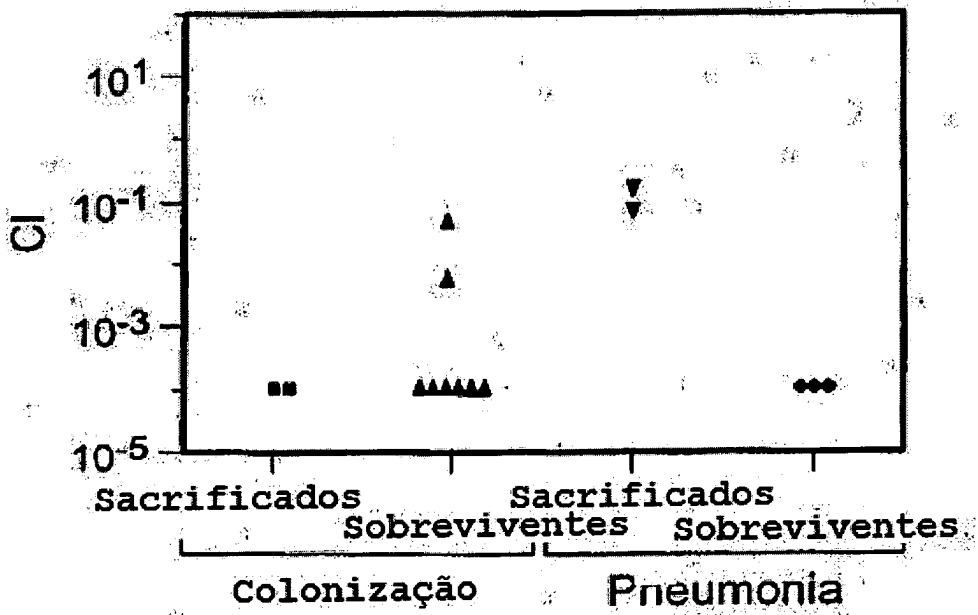


FIG. 5D

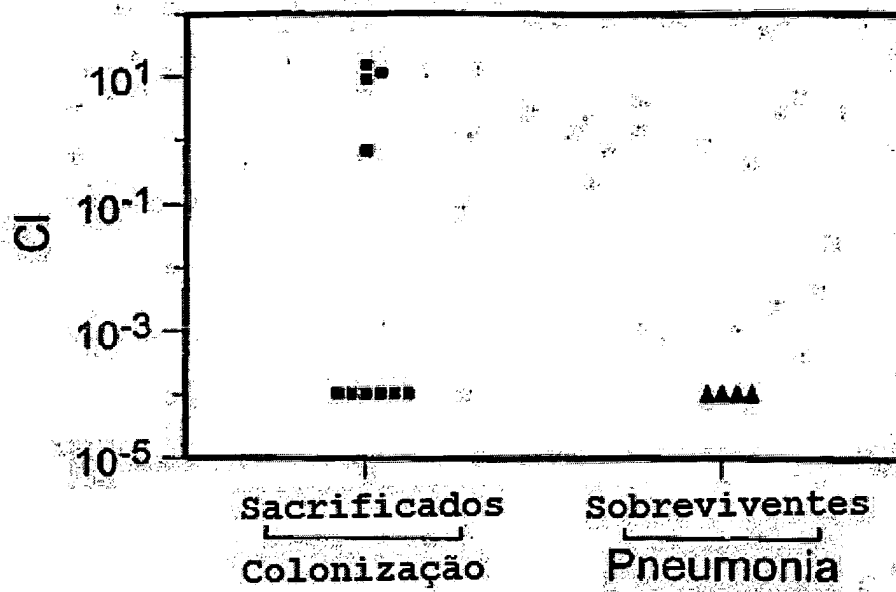


FIG. 5E

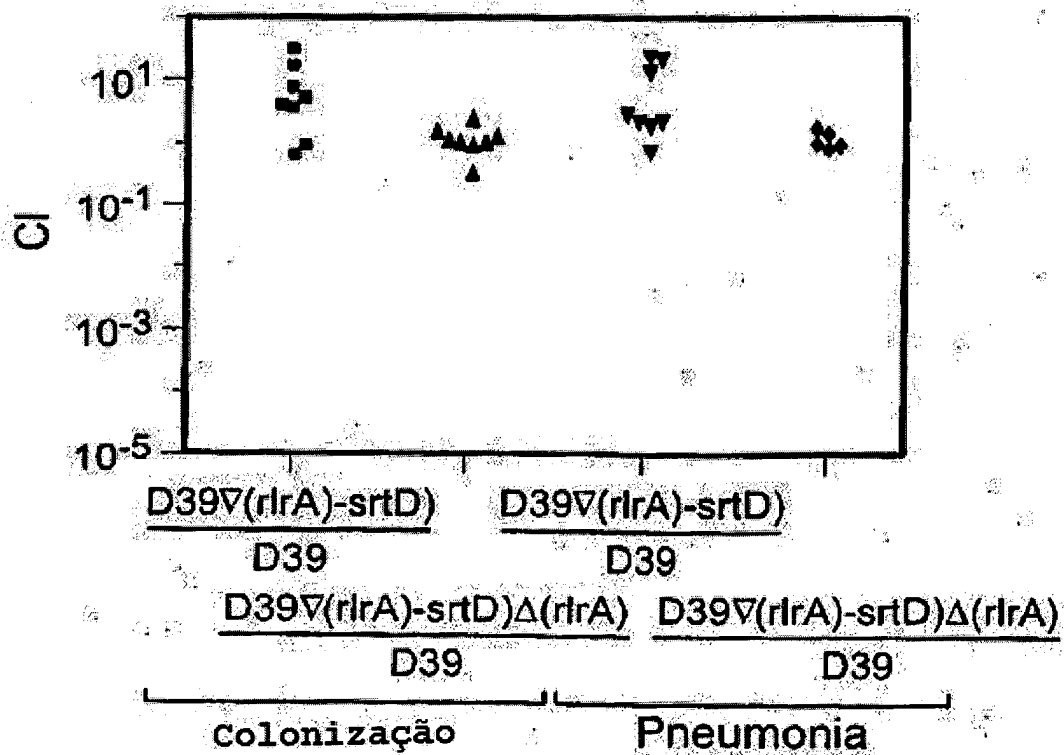


FIG. 5F

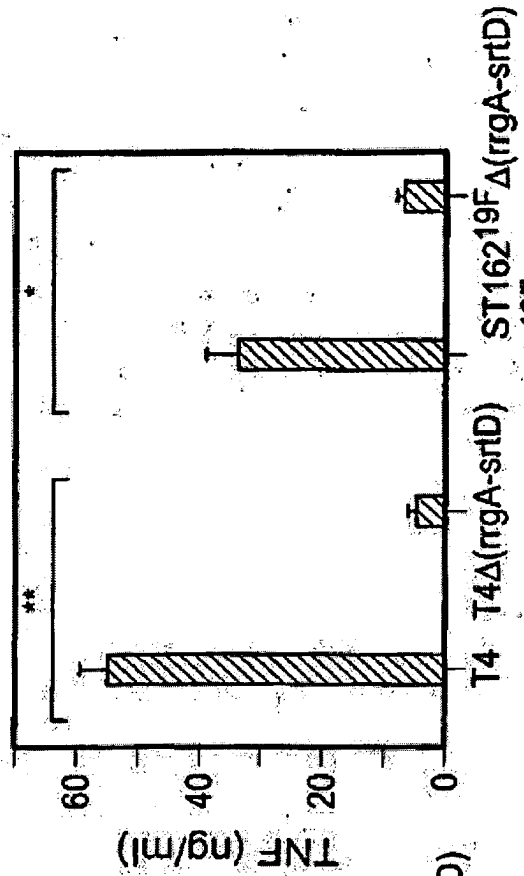


FIG. 6B

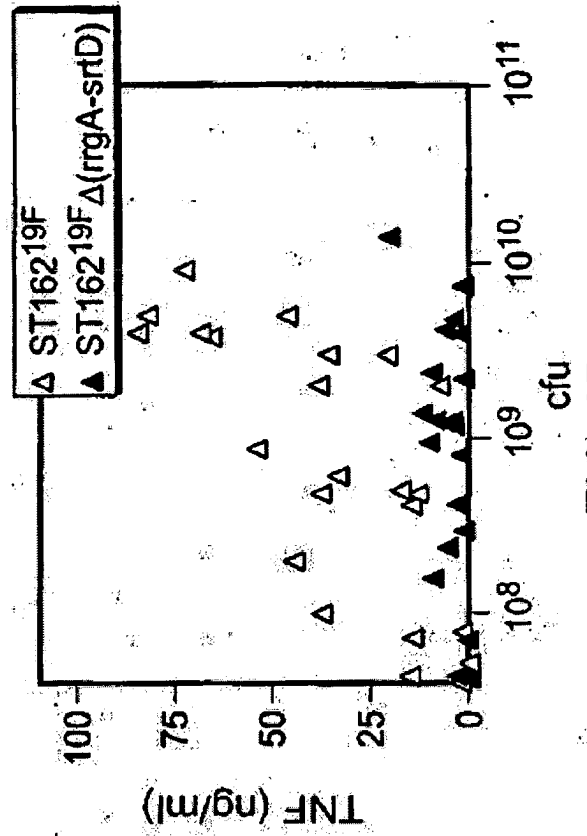


FIG. 6D

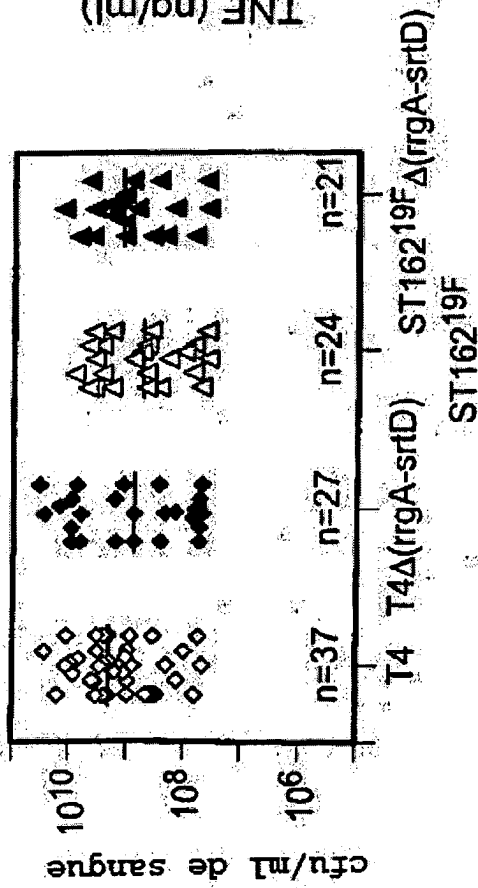


FIG. 6A

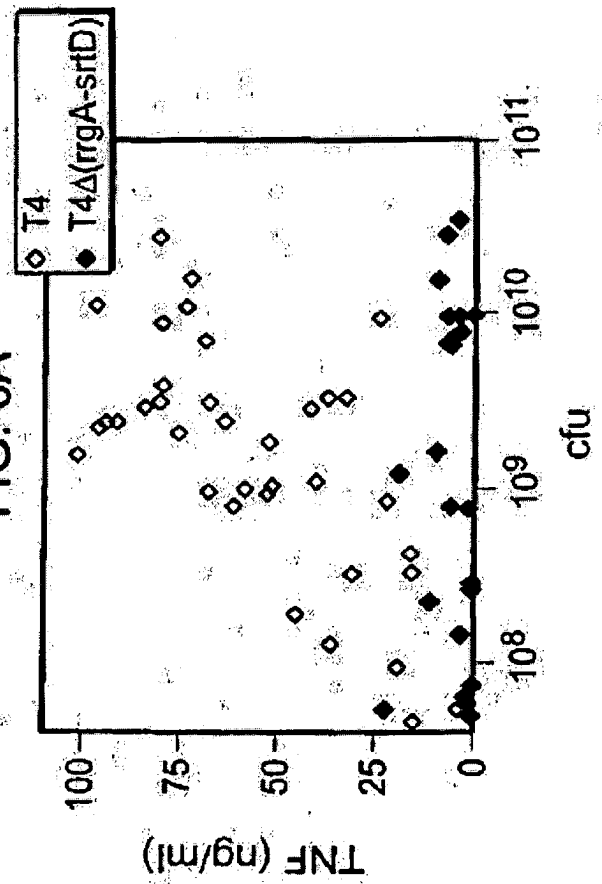


FIG. 6C

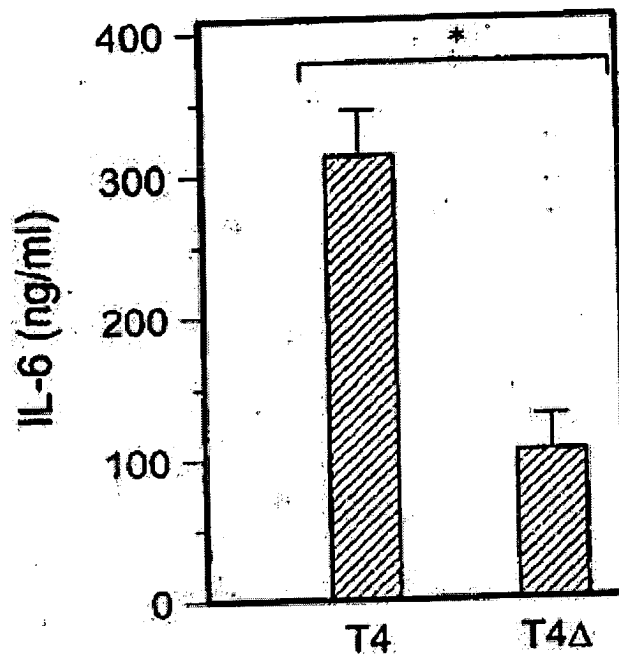


FIG. 7A

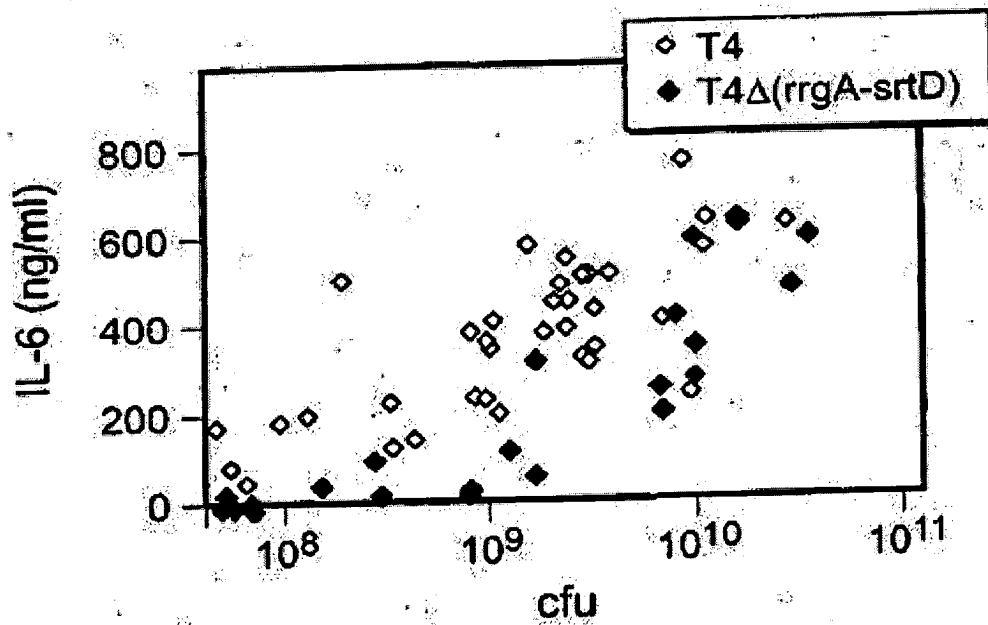


FIG. 7B

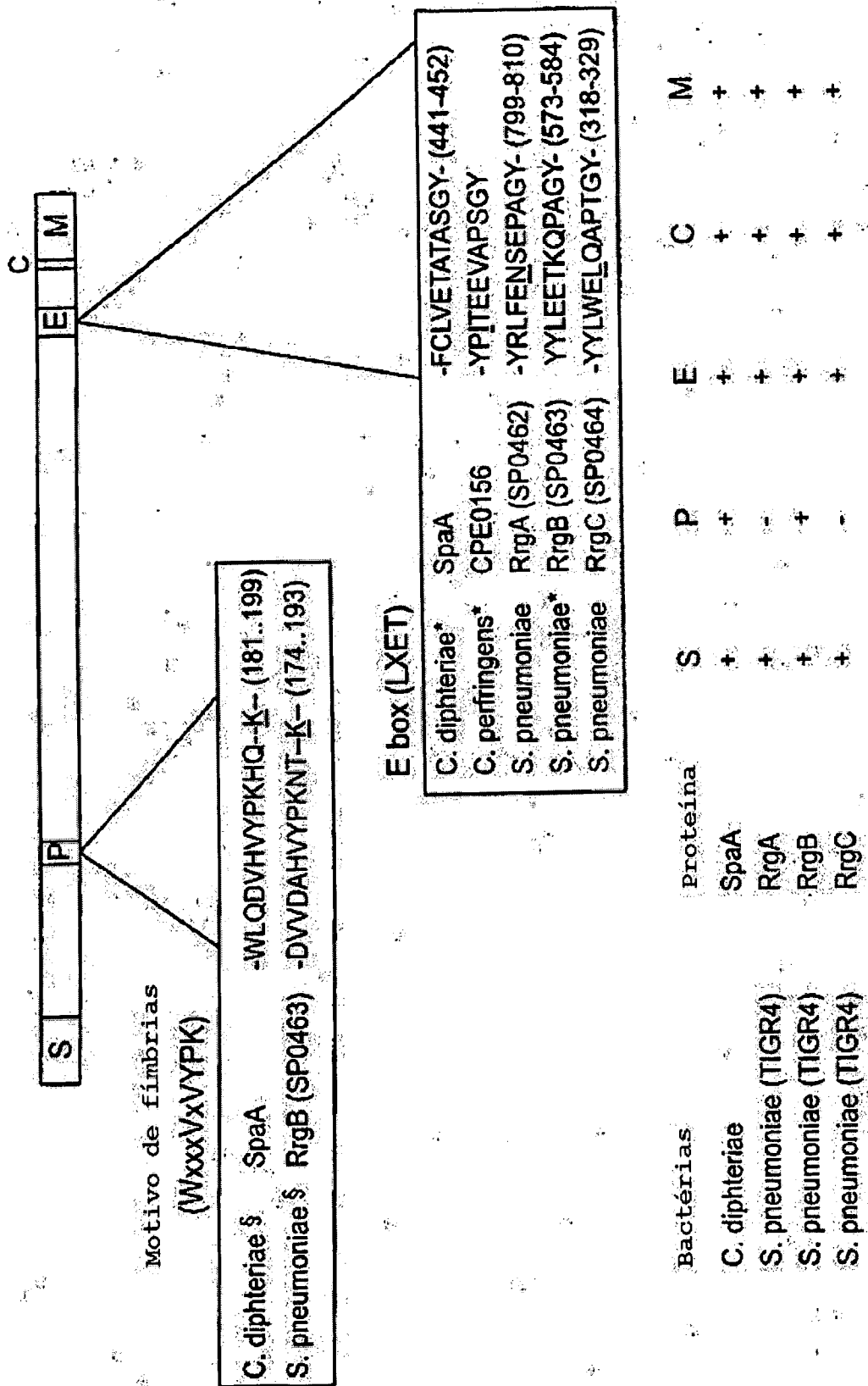


FIG. 8

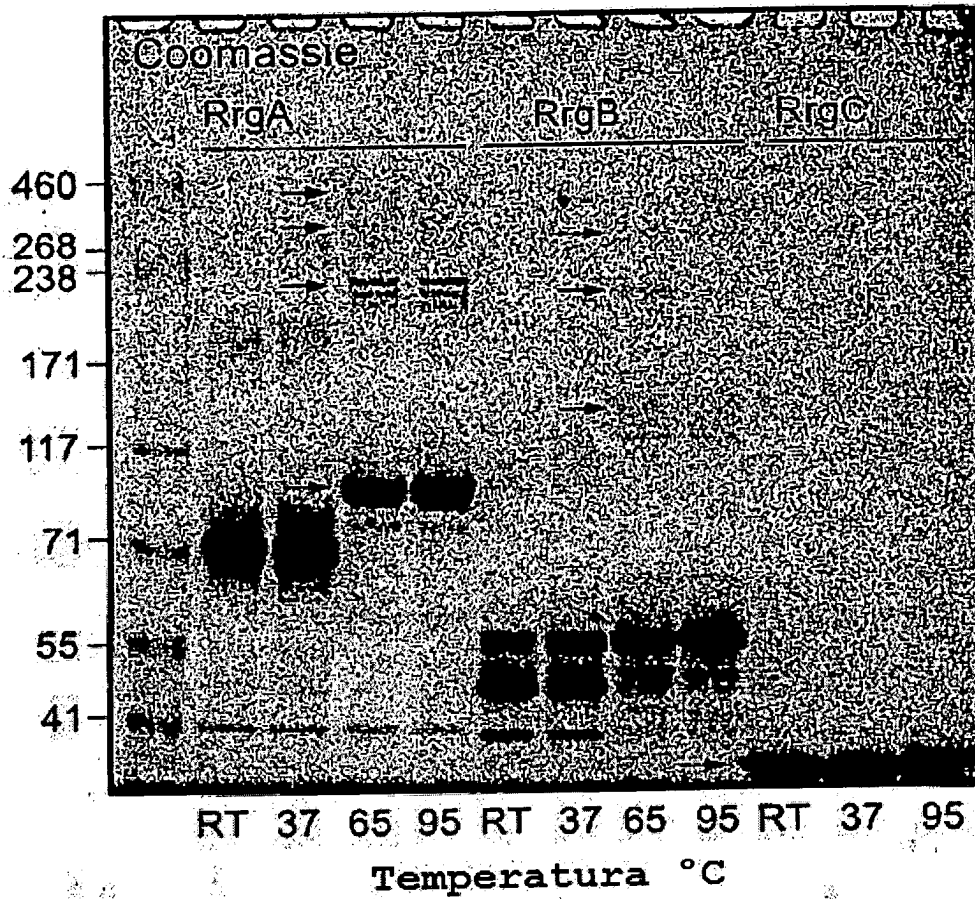


FIG. 9A

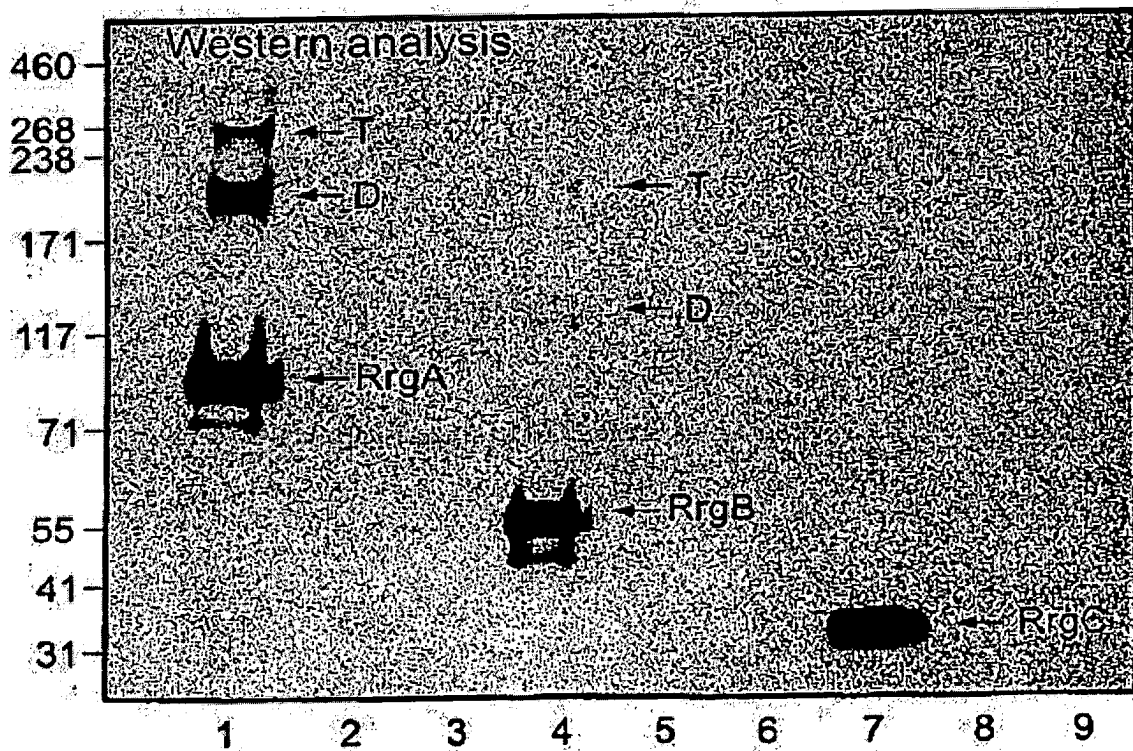


FIG. 9B

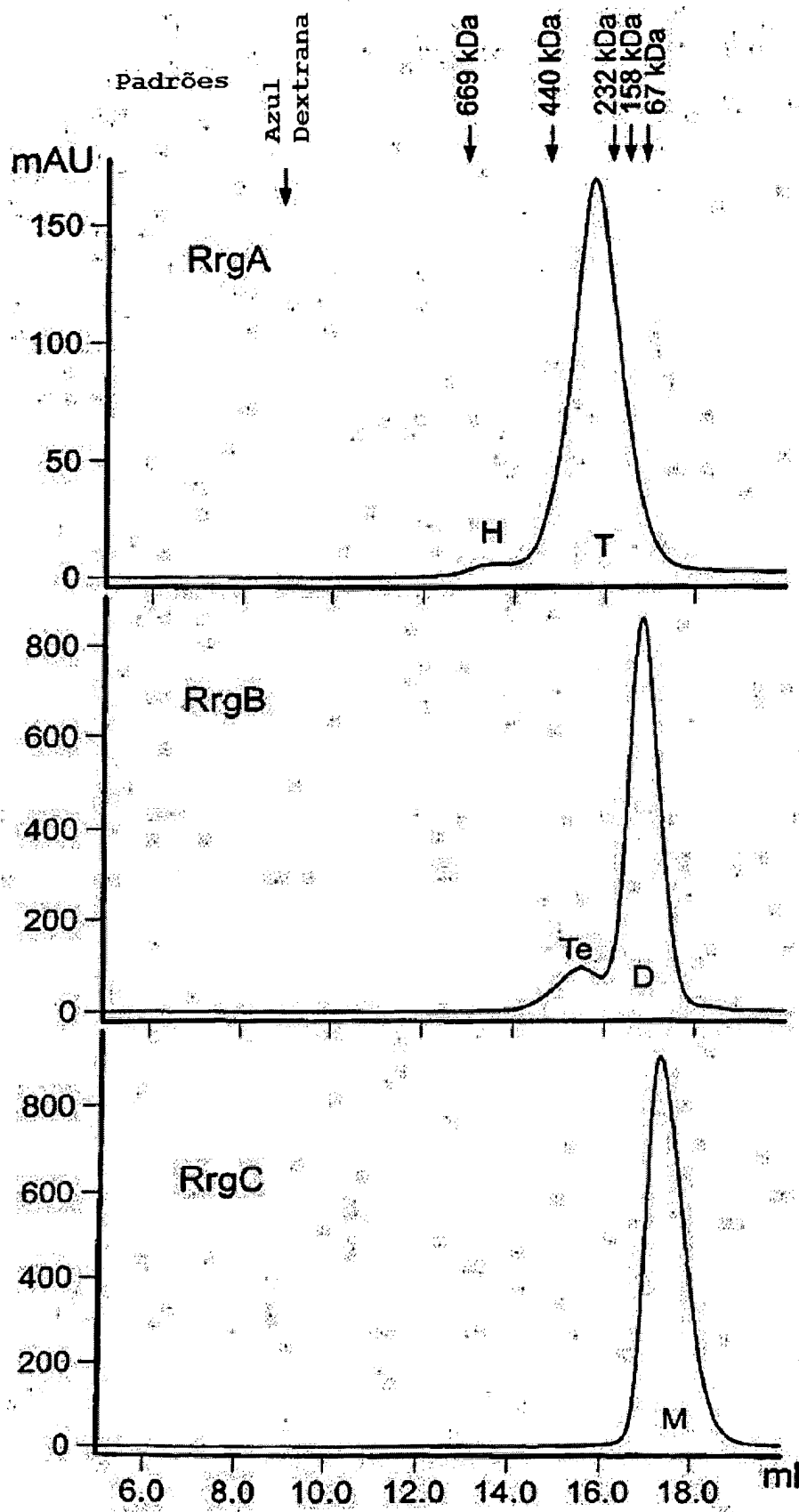


FIG. 9C

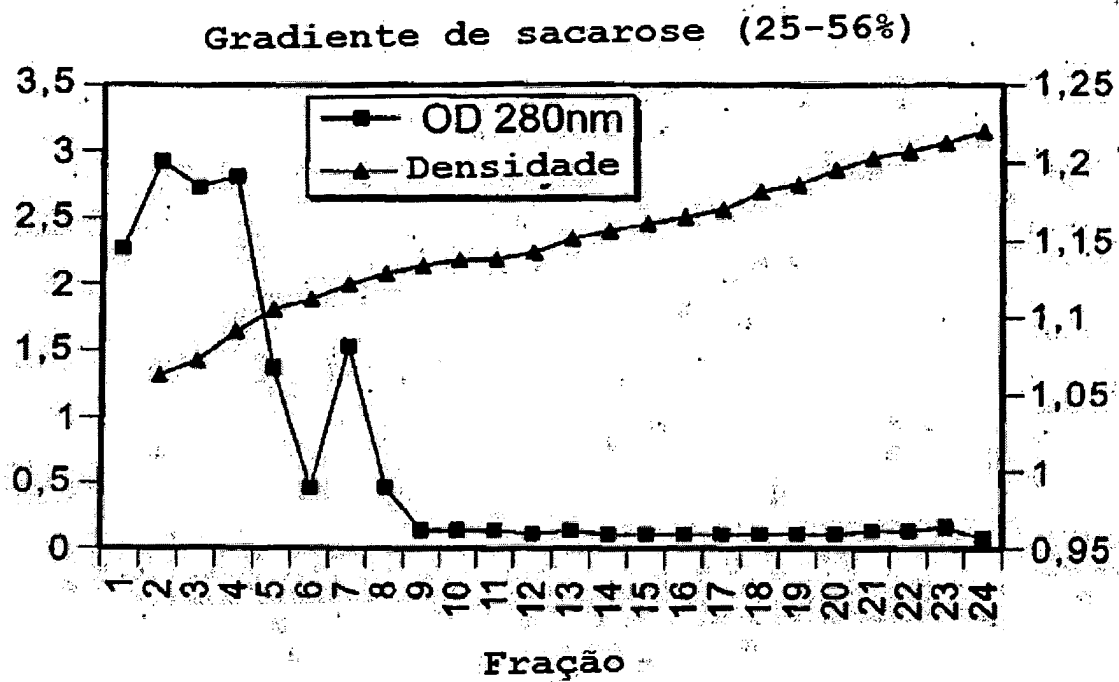


FIG. 10A

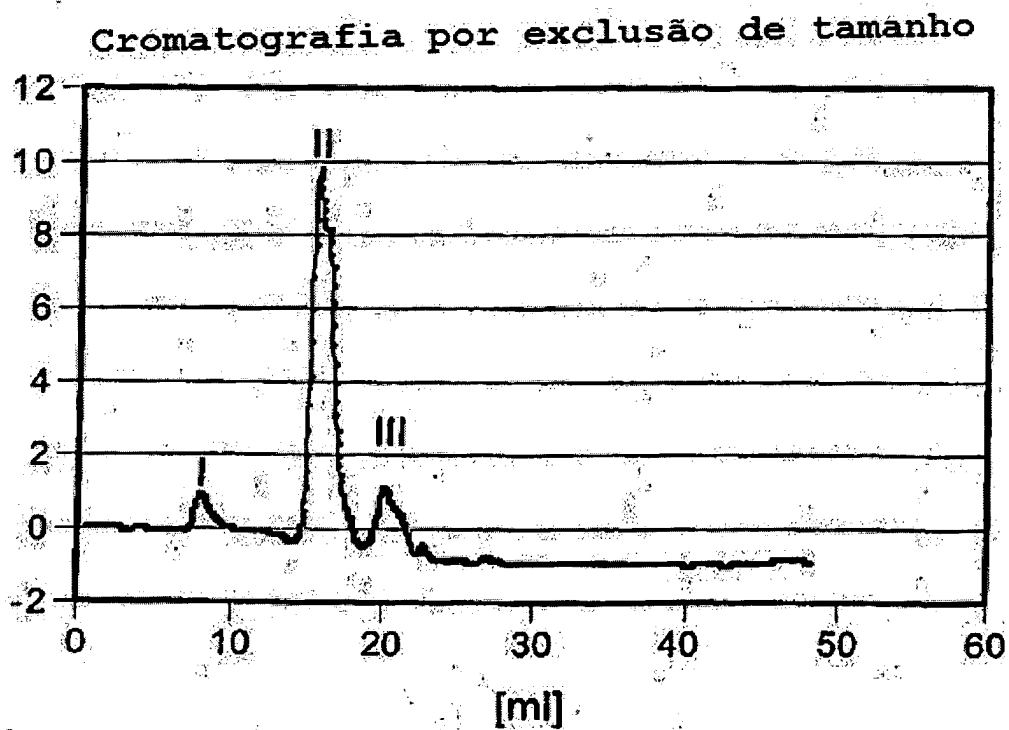


FIG. 10B

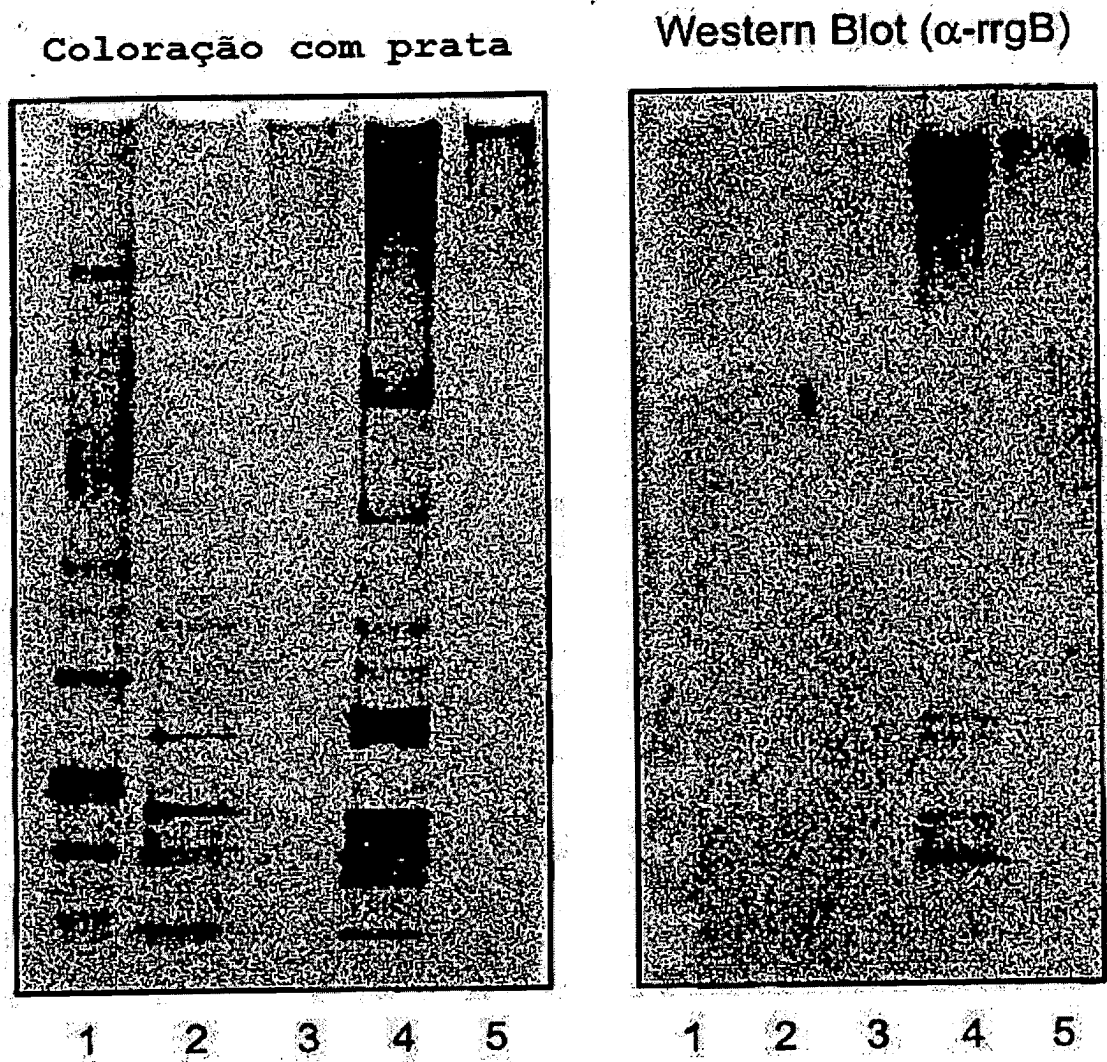


FIG. 10C

1 ATGAAATCAATCAACAAATTTTAAACAATGCTTGCTGCTTATTACTGACAGCGAGTAGC
 1 M K S I N K F L T M L A A L L L T A S S
 61 CTGTTTTCAGCTGCAACAGTTTTTGGCG/GCTGGGACGACAAACAICITGTTACGGTTCAT
 21 L F S A A T V F A / A G T T T S V T V H
A G T T T S V T V H

121 AAACCTATTGGCAACAGATGGGATATGGATAAAAATTGCAAAIGAGTTAGAAACAGGTAAC
 41 K L L A T D G D M D K I A N E L E T G N
X L

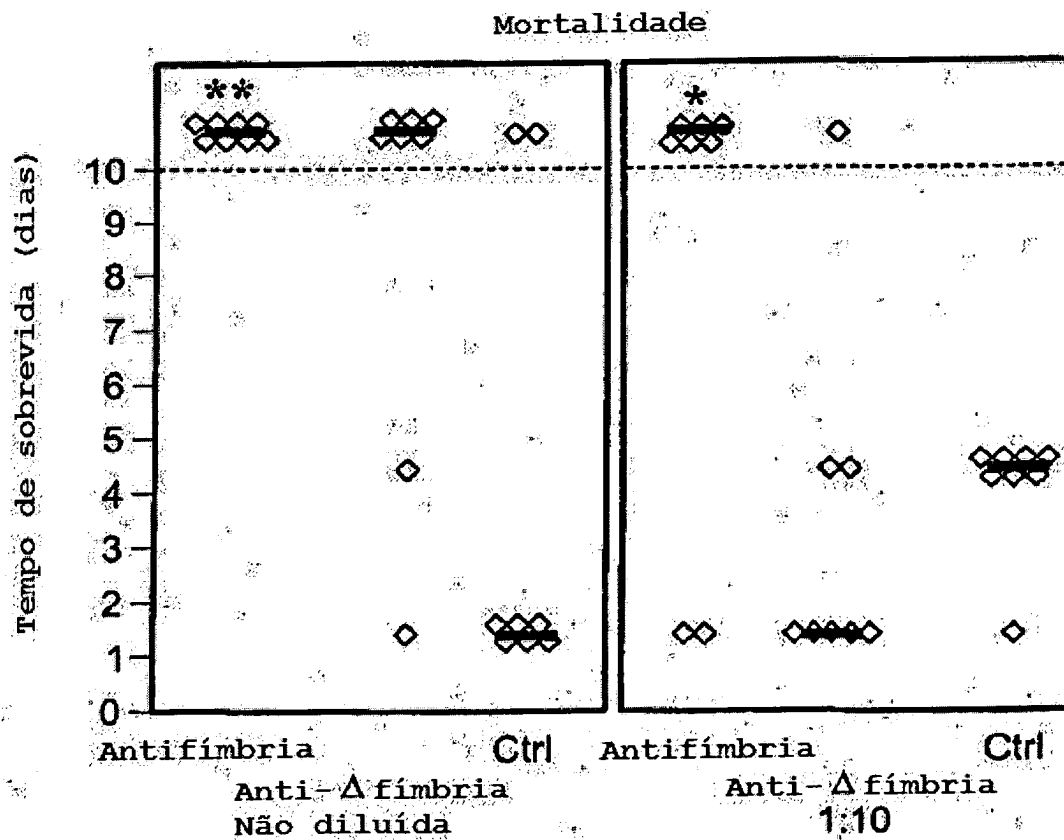
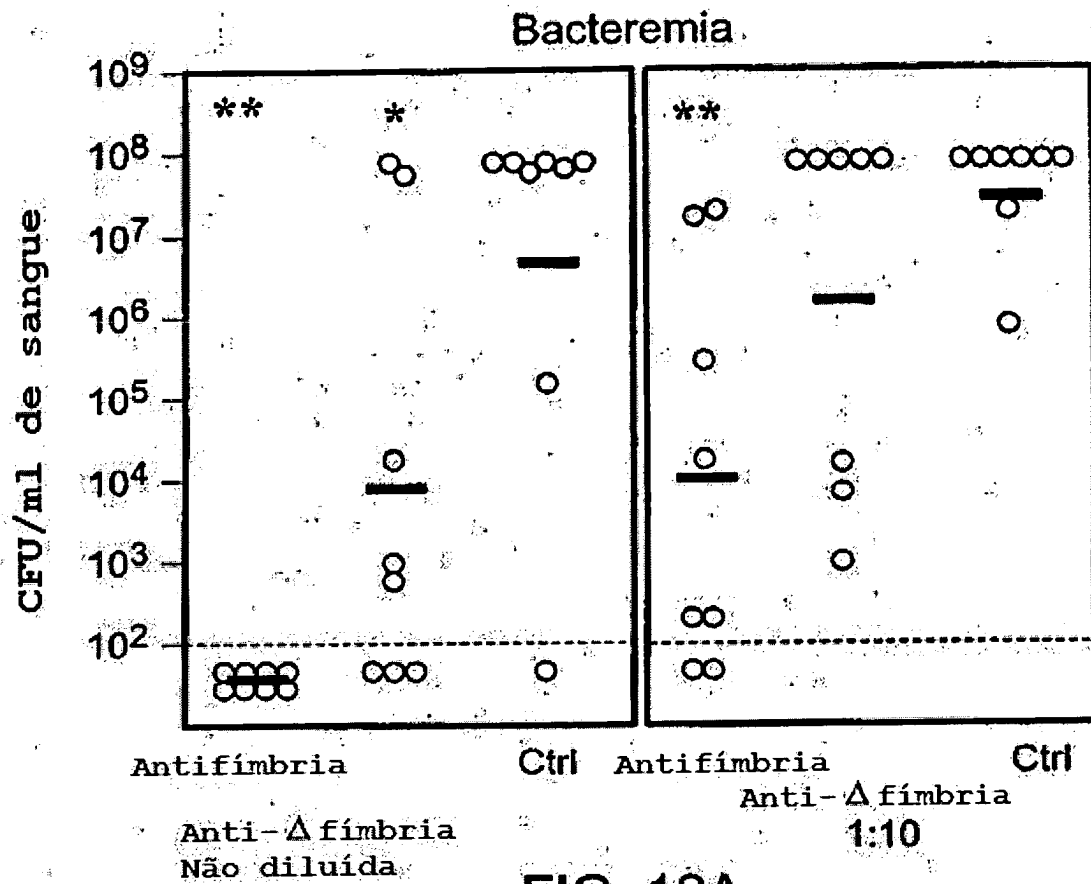
FIG. 11A

1330 GTTGTACATAATGGTAAAGTTTGICAAAGTTAATGATAAAGATAATCGT
 444 V V T Y G K K F V K V N D K D N R

1381 TTAGCTGGGGCAGAAATTGTAAATGGCAAAATGCTGATAATGCTGGTCAATATTAGCAGCT
 461 L A G A E F V I A N A D N A G Q Y L A R
 L A G A E F V I A N A D N A G Q Y L A R

1441 AAAGCAGATAAAGTGAGTCAAGAAGAGCAGTTGGTTGTACAAACAAAG.....
 481 K A D K V S Q E E K Q L V V T T K

FIG. 11B



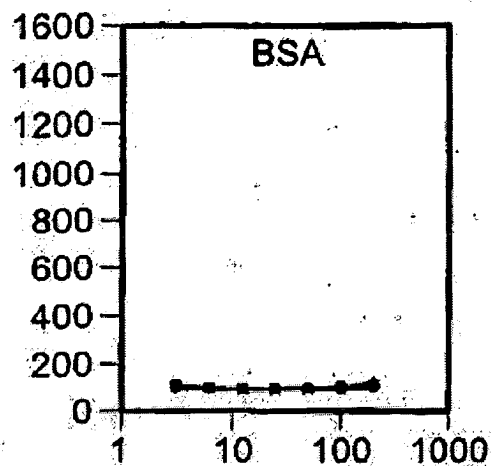


FIG. 13A

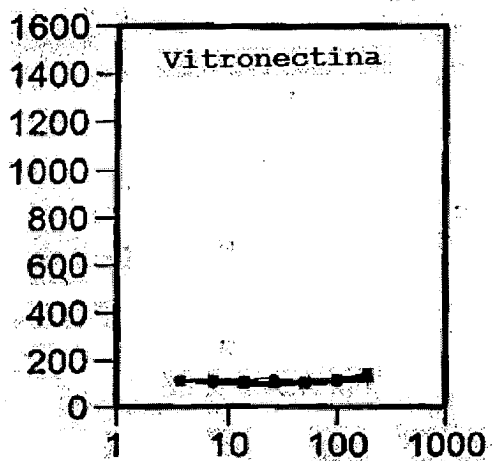


FIG. 13C

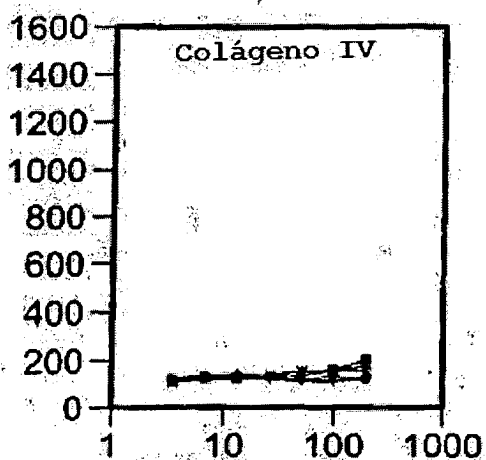


FIG. 13E

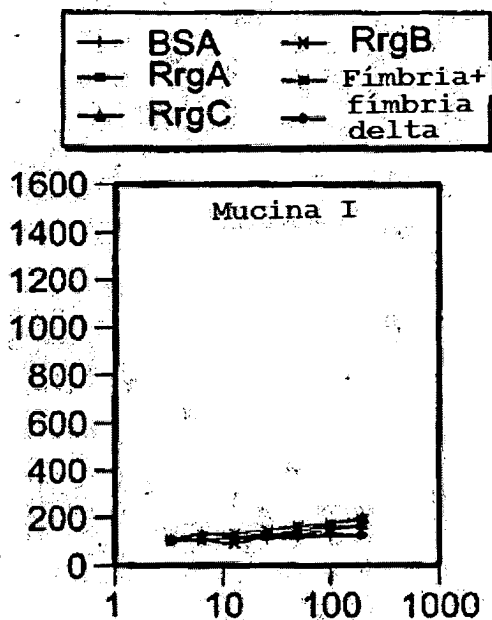


FIG. 13B

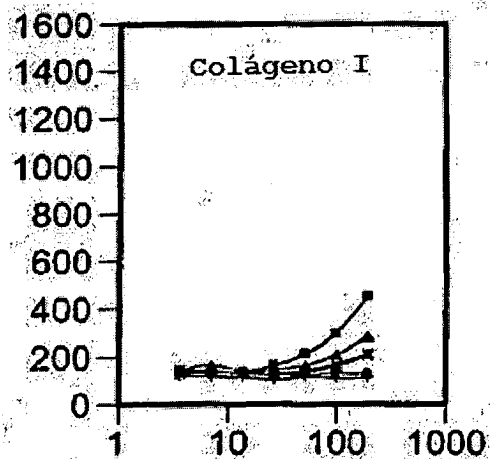


FIG. 13D

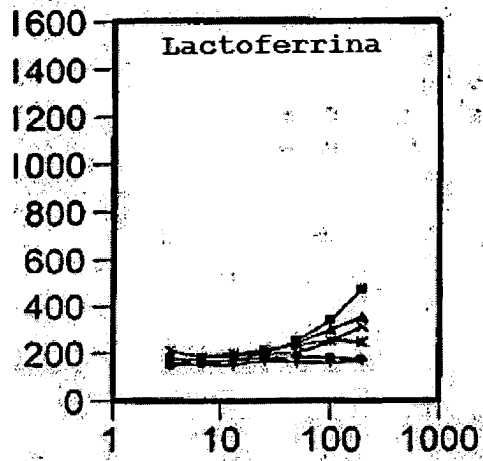


FIG. 13F

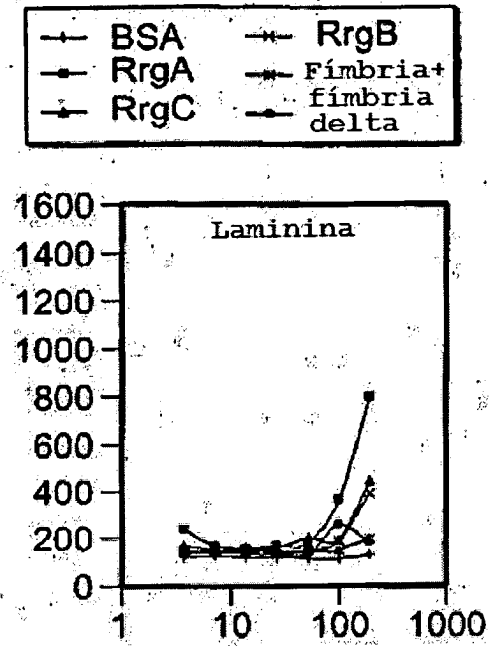


FIG. 13G

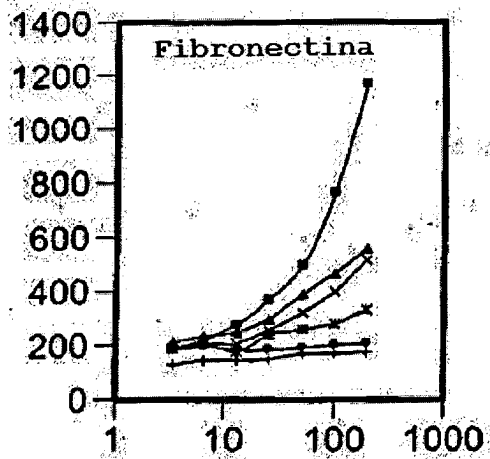


FIG. 13H

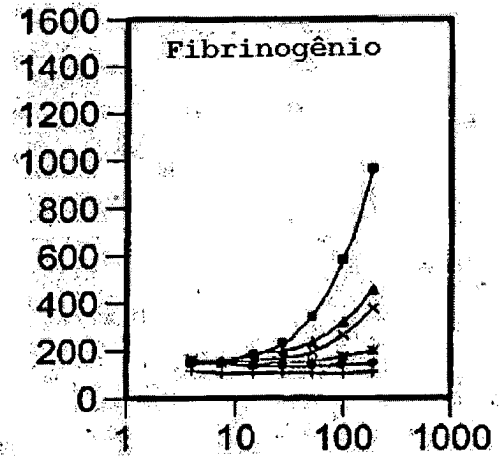


FIG. 13I

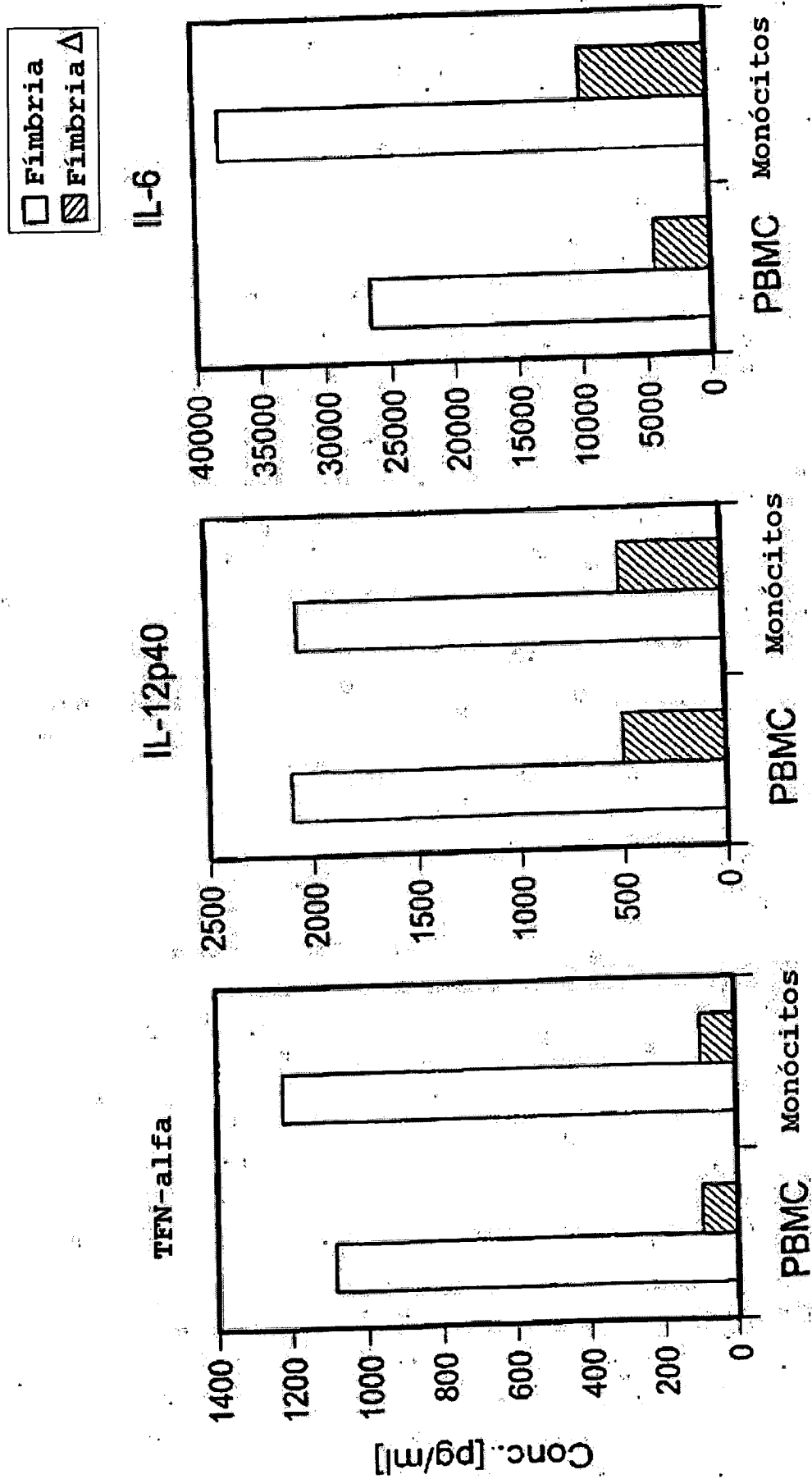


FIG. 14A

FIG. 14B

FIG. 14C

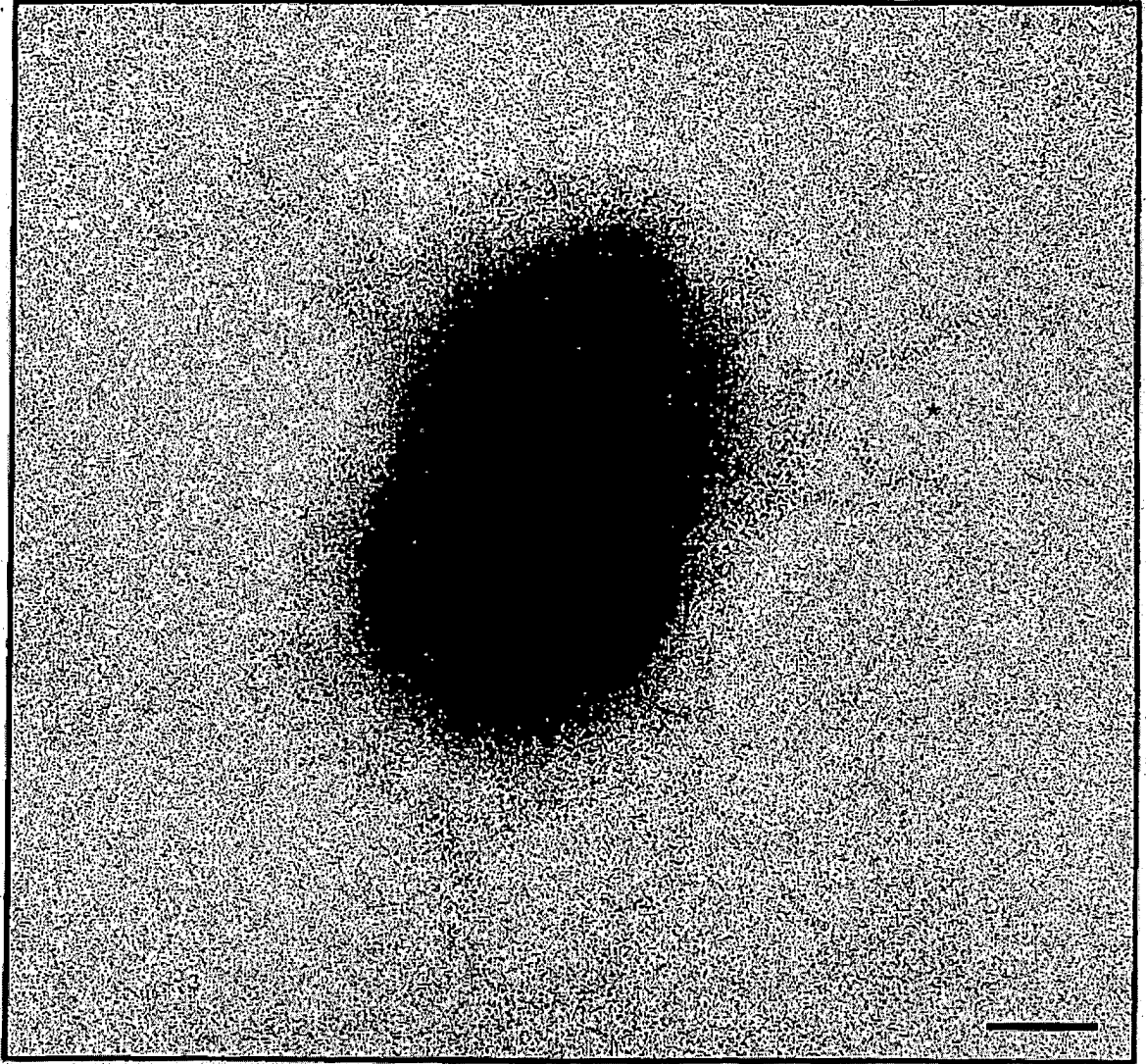


FIG. 15

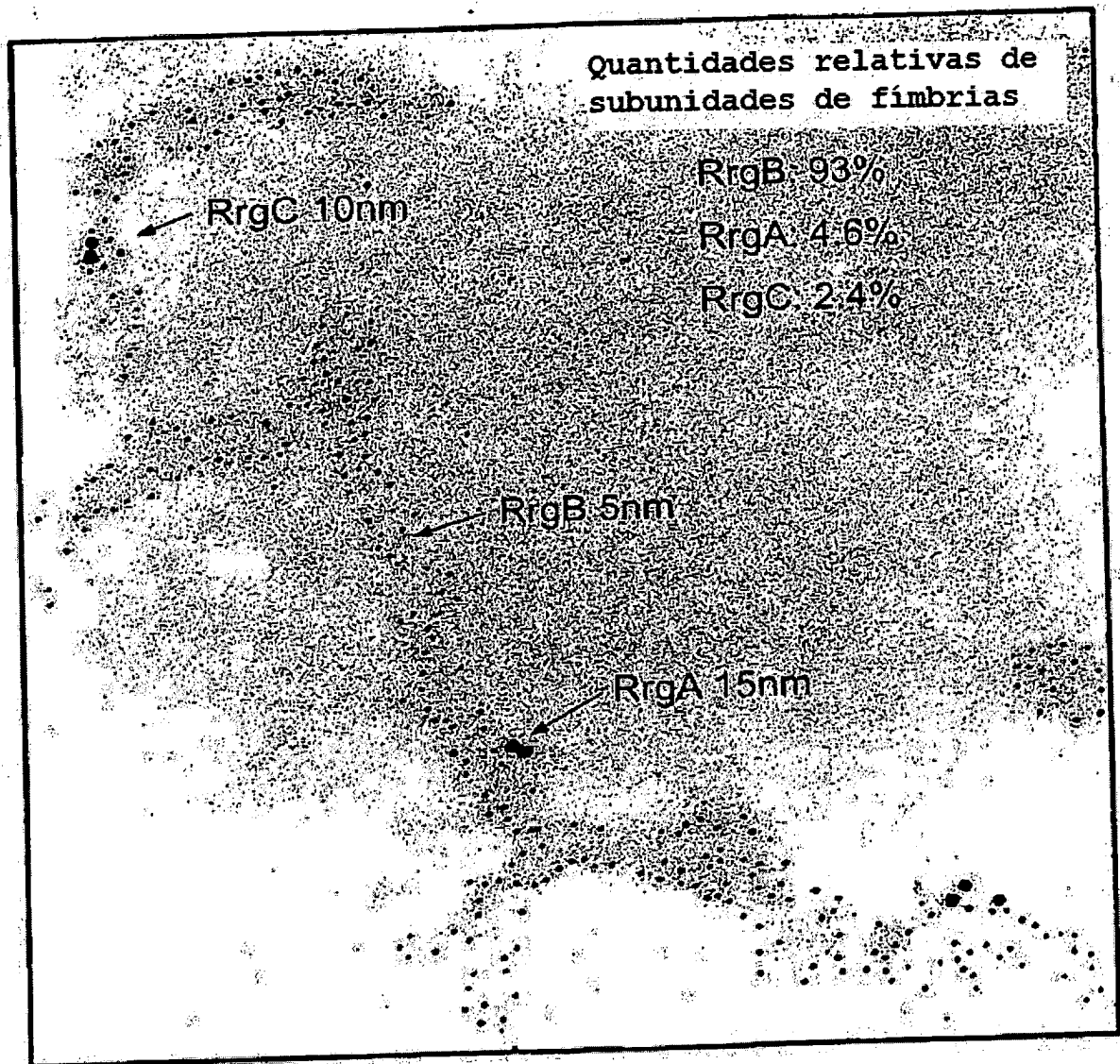


FIG. 16

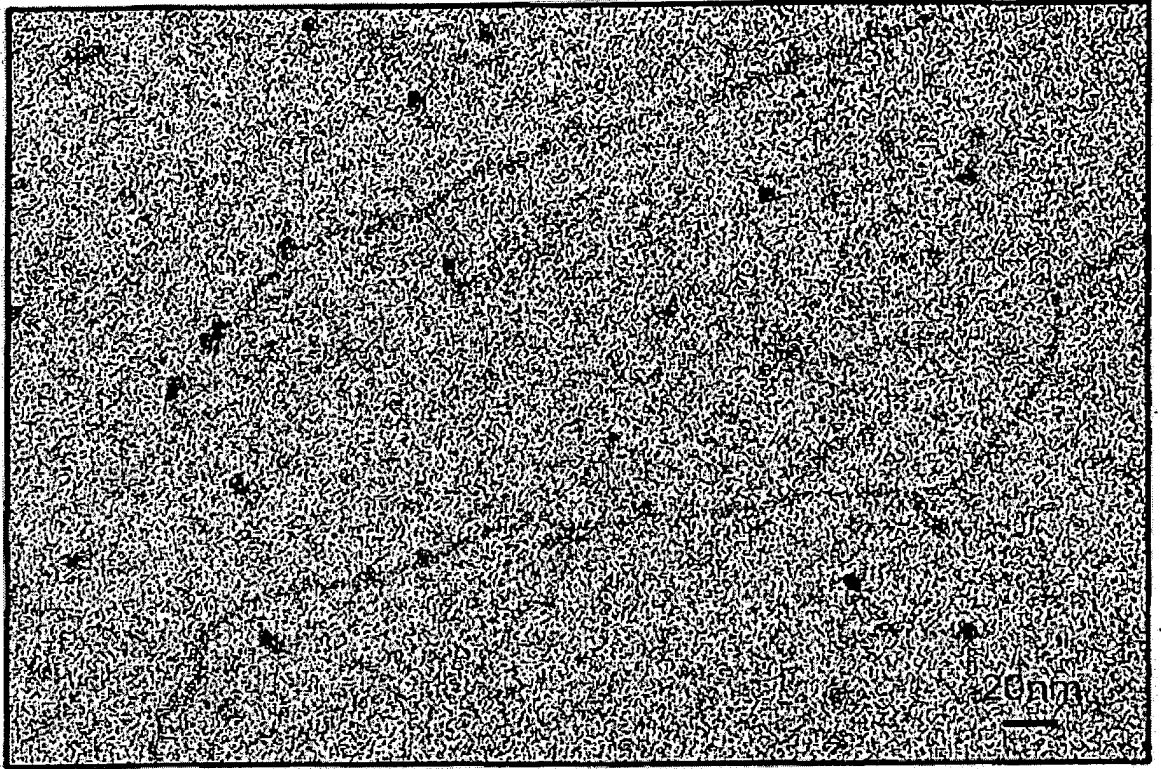


FIG. 17

Cálculo do perfil da densidade radial

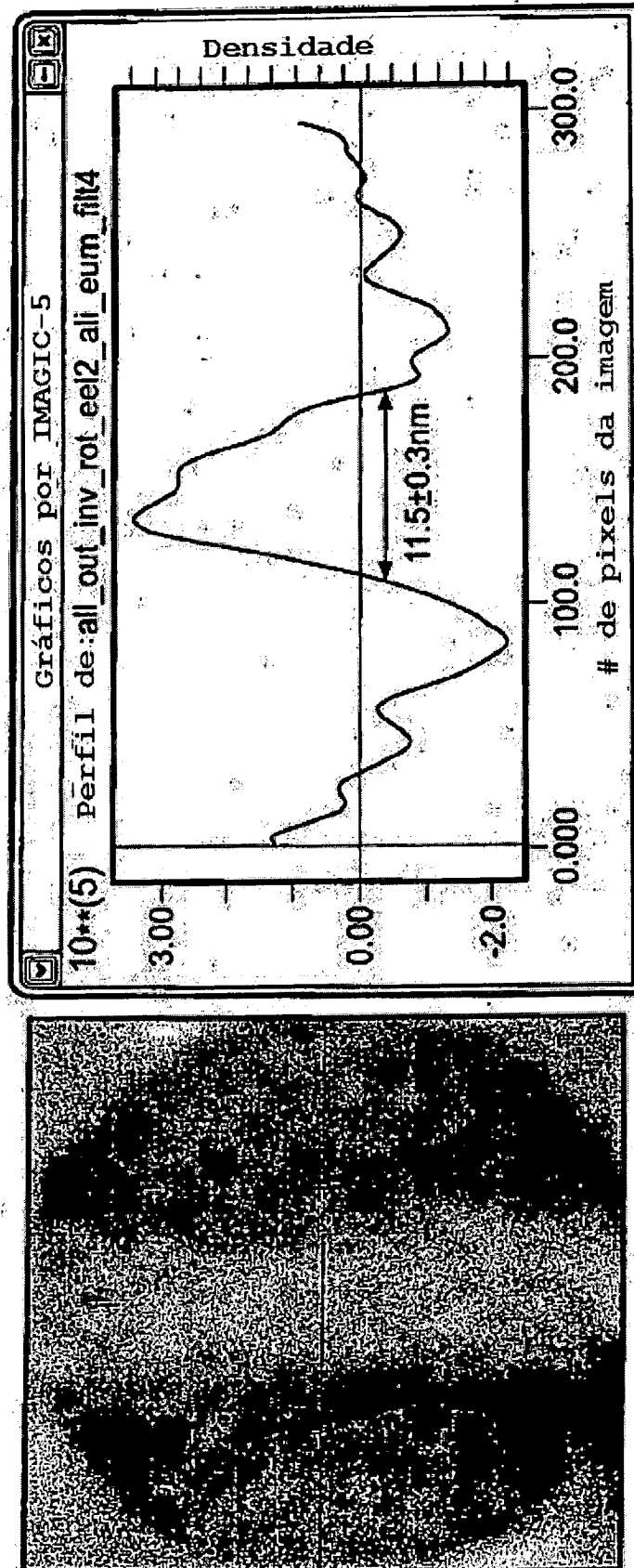


FIG. 18

Cálculo do volume

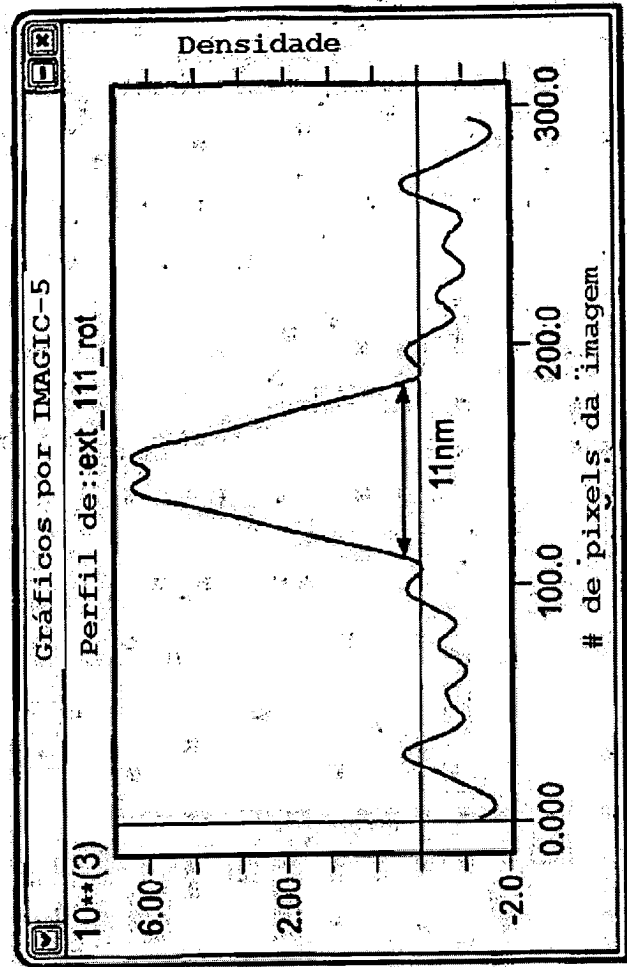
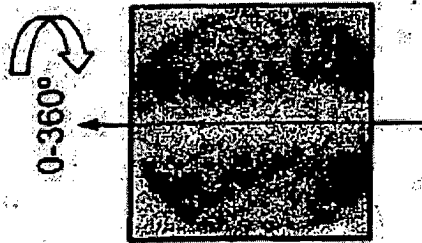


FIG. 19

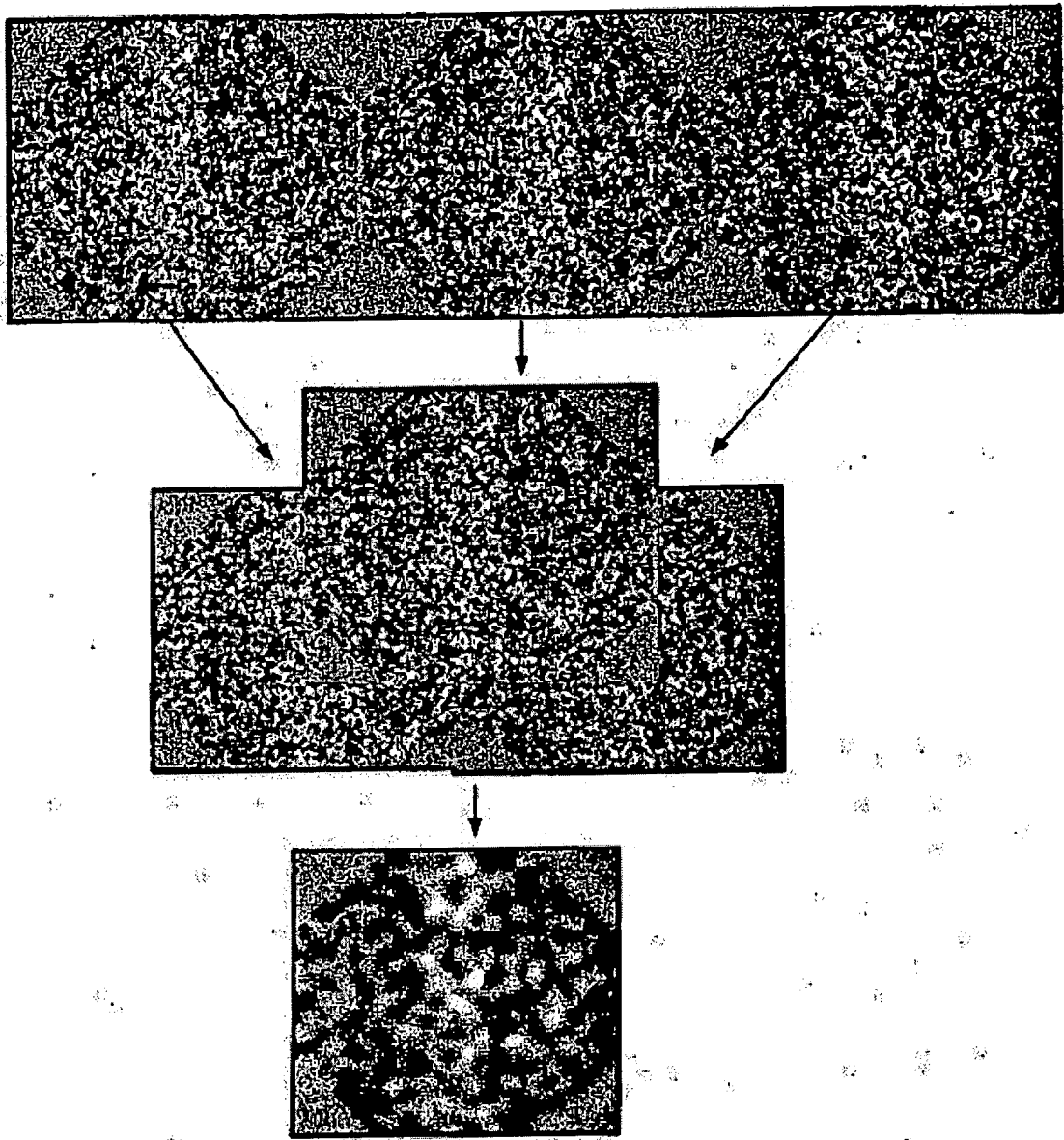


FIG. 20

rotações e projeções da fímbria real

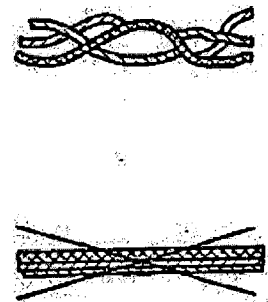
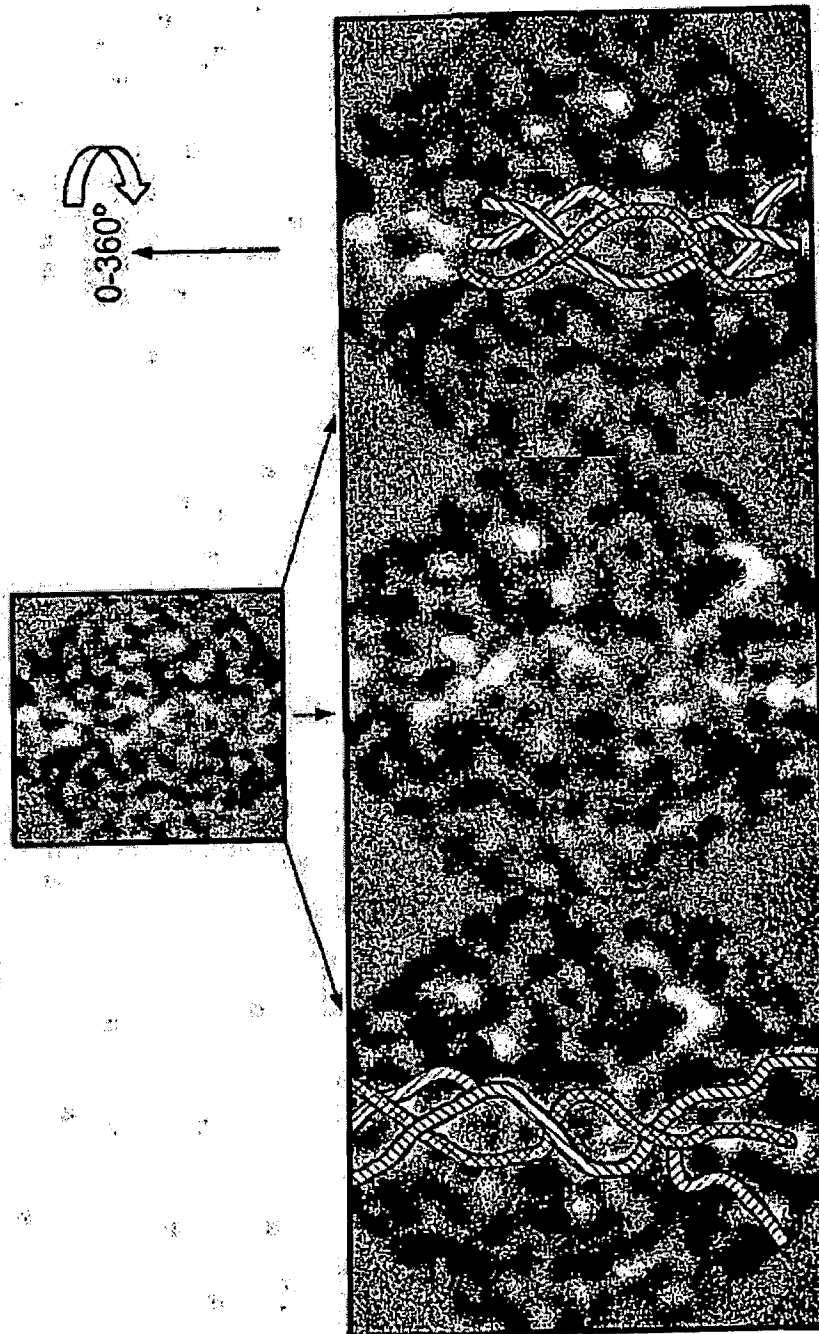
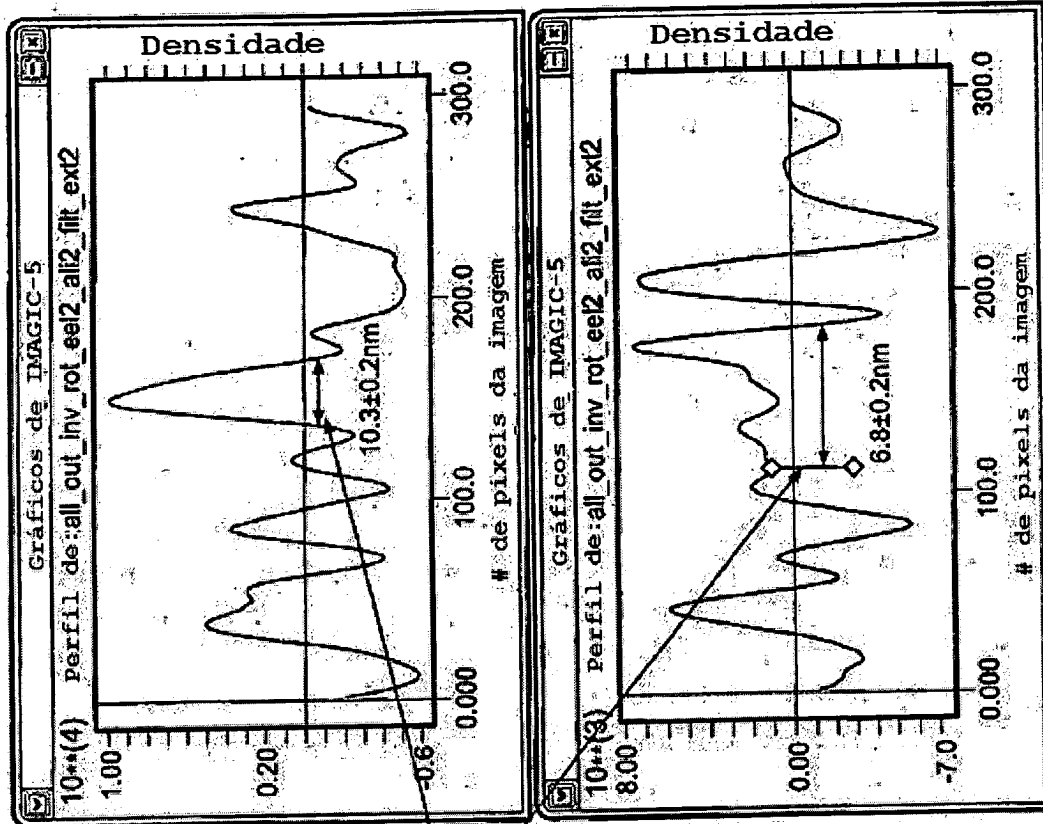
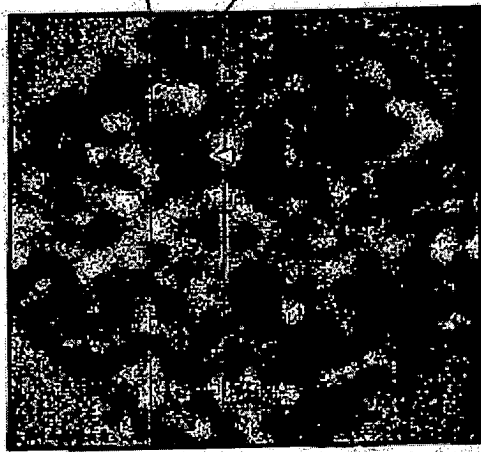


FIG. 21

Perfis da densidade radial



Dados preliminares da estrutura das fímbrias

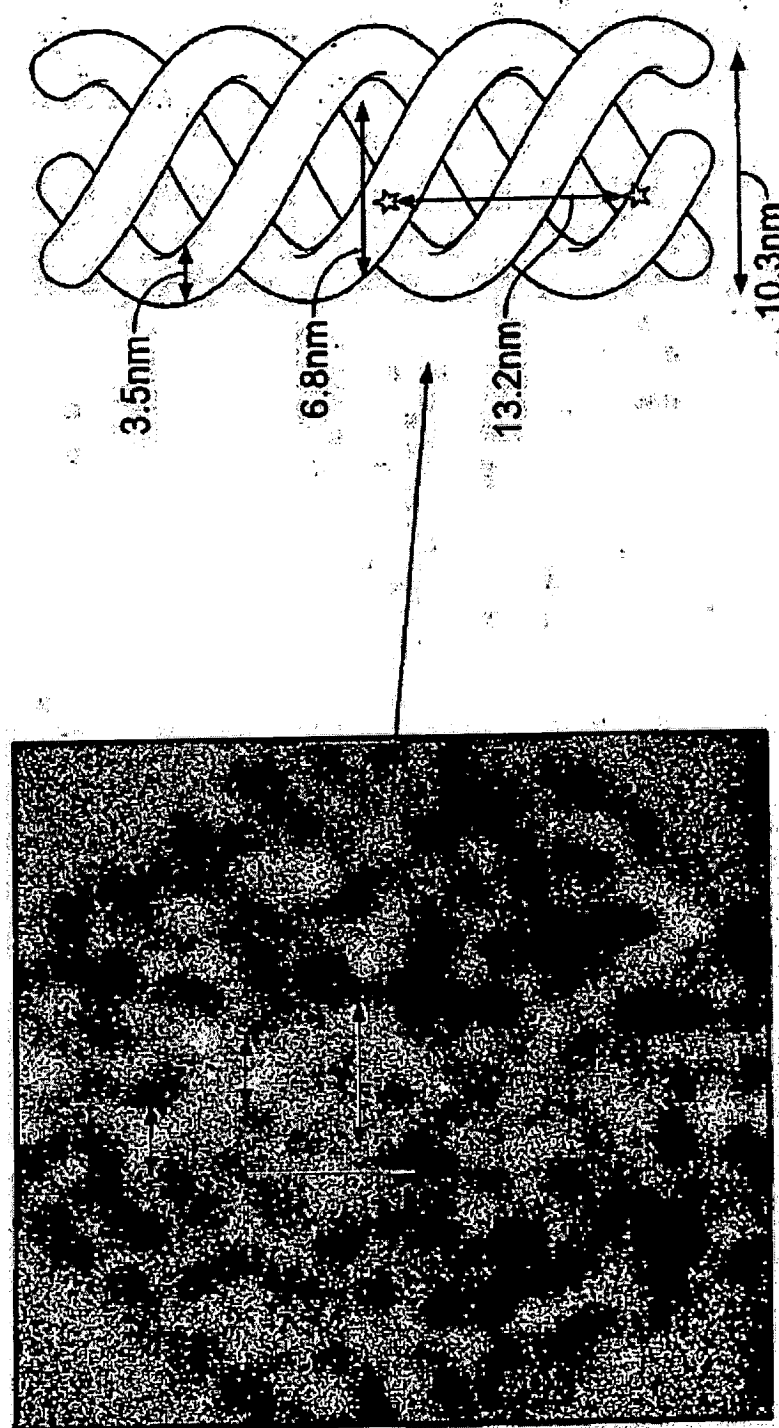


FIG. 23

PURIFICAÇÃO DE ANTÍGENOS BACTERIANOS

São apresentados métodos de isolamento de fímbrias e de estruturas semelhantes a fímbria a partir de bactérias gram-positivas, incluindo *Streptococcus pneumoniae*, e
5 composições que incluem essas fímbrias isoladas. Essas composições são úteis como composições imunogênicas para a produção de anticorpos e imunoestimulação. Também são apresentados métodos de inibição de *Streptococcus pneumoniae* e métodos de identificação de inibidores de
10 *Streptococcus pneumoniae*.