



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

(11) PI 0100837-4 B1



(22) Data do Depósito: 23/02/2001

(45) Data de Concessão: 02/04/2019

(54) Título: SEQUÊNCIA DE DNA QUE CODIFICA A PROTEÍNA EXTERNA DE MEMBRANA ANTIGÊNICA E ESPECÍFICA DE SALMONELLA TYPHI

(51) Int.Cl.: C12N 15/31; C07K 14/255; C12N 1/21; A61K 39/112; A61P 37/00.

(30) Prioridade Unionista: 28/02/2000 MY 20000765.

(73) Titular(es): UNIVERSITI SAINS MALAYSIA.

(72) Inventor(es): ASMA BINTI ISMAIL; ONG KOK HAI; MANICKAM RAVICHANDRAN; ZAINOODIN S.A KADER.

(57) Resumo: "SEQUÊNCIA DE DNA QUE CODIFICA A PROTEÍNA EXTERNA DE MEMBRANA ANTIGÊNICA E ESPECÍFICA DE Salmonella typhi". O material genético que codifica para uma proteína externa de membrana específica (PEM) de Salmonella typhi foi isolado e caracterizado. Este material genético (ST50) permite a produção de proteínas/peptídeos/DNA/RNA específicos para uso em diagnósticos, detecção da bactéria S. typhi ou na produção de vacinas para febre tifóide.

“SEQUÊNCIA DE DNA QUE CODIFICA A PROTEÍNA EXTERNA DE MEMBRANA ANTIGÊNICA E ESPECÍFICA DE *Salmonella typhi*”

42

Campo da Invenção

Esta invenção se refere ao campo da engenharia genética, diagnósticos e vacinas em relação ao gene que codifica a PEM específica de *S. typhi* (ST50). O peso molecular estimado para a proteína é de 50 kDa. Esta proteína encontra-se disponível como um resultado de engenharia genética do gene que a codifica.

Descrição dos Fundamentos

A febre tifóide permanece como um problema de saúde pública na maioria dos países em desenvolvimento. Os métodos convencionais disponíveis de diagnóstico da doença permanecem não satisfatórios uma vez que estes são muito lentos para permitir a rápida decisão pelo clínico. O método de cultura pode apresentar especificidade mas lhe falta sensibilidade e velocidade. Este produziu resultados dentro de 2-7 dias e casos de cultura tifóide negativa foram reconhecidos. O teste de detecção de anticorpo (teste Widal) embora amplamente utilizado, é desprovido de velocidade, sensibilidade e especificidade. Para uma significativa interpretação do teste, a demonstração do aumento de 4 vezes nos títulos de anticorpo entre soros agudos e convalescentes de 10-14 dias posteriores foi essencial. Um teste diagnóstico ideal para tifóide deve ser rápido, fácil de ser realizado, sensível assim como específico. Nenhum dos métodos acima mencionados satisfazem os critérios. Assim há uma necessidade em desenvolver um teste rápido e específico. Combinado com um diagnóstico sensível, o teste forneceria uma determinação imediata, efetiva e precisa da febre tifóide. Buscando o diagnóstico rápido para febre tifóide, nós previamente obtivemos um significativo avanço no diagnóstico de tifóide com a descoberta da PEM 50 kDa que é específica para o agente etiológico, *Salmonella typhi* (Ismail A, *et al.*, 1991 Biochem. Biophys. Res. Commun. 27:301-5). A descoberta do antígeno específico de 50 kDa na membrana externa de *Salmonella typhi* foi patenteada na Malásia (patente Malásia No. MY-106708-A). Usando a PEM isolada, nós desenvolvemos com sucesso um teste EIA pontual rápido (TYPHIDOT™) para detectar a presença de anticorpos IgM e IgG específicos para a bactéria. O teste apresenta uma sensibilidade > 95%, um valor alto de prognóstico negativo e poderia produzir resultados dentro de 1-3 horas. A detecção de IgM sozinho ou com IgG sugeriria tifóide aguda enquanto

que a detecção de IgG apenas traria várias interpretações tais como convalescença ou possível re-infecção. Devido à falta de imunidade efetiva para a febre tifóide, pacientes de áreas altamente endêmicas freqüentemente apresentam re-infecções. No caso de re-infecção comum, haverá uma resposta imune secundária com um significativo efeito de “elevação” de IgG sobre IgM tal que o último pode não ser detectado. Uma possível estratégia para resolver este problema é “desmascarar” a presença de IgM pela remoção total de IgG. O desenvolvimento de um teste de detecção de IgM em 3 horas (TYPHIDOT-M™) é útil em áreas altamente endêmicas uma vez que este poderia diferenciar casos novos dos convalescentes. Dados dos estudos para demonstrar a sensibilidade, especificidade e vantagens dos vários testes comparados aos métodos convencionais mostraram que os testes forneceram alternativas confiáveis ao teste Widal.

De modo a produzir a proteína em larga escala, nós purificamos e determinamos a sequência de aminoácidos da PEM 50 kDa. Com base nestes dados nós isolamos, clonamos e sequenciamos o DNA que codifica para a PEM 50 kDa. Adicionalmente, nós identificamos o epitopo imunogênico da proteína por mapeamento de epitopo. Este epitopo foi usado com sucesso para o escalonamento da PEM 50 kDa no diagnóstico de febre tifóide.

Resumo da Invenção

A presente invenção fornece material genético que codifica para a PEM 50 kDa de *Salmonella typhi*. O material genético pode ser usado para produzir quantidades suficientes de proteínas a serem usadas nos métodos diagnósticos para febre tifóide. Adicionalmente, o material genético pode ser usado como um marcador para a detecção de *S. typhi*. A proteína íntegra ou epitopos derivados da proteína podem ser usados em diagnósticos e desenvolvimento de vacinas para febre tifóide. Outro uso inclui o desenvolvimento de vacinas DNA/RNA para febre tifóide.

Descrição dos Desenhos

A figura 1 é um mapa do plasmídeo do clone de ST50 no vetor de clonagem TOPO 2,1. Os marcadores de antibióticos ampicilina (AmpR), kanamicina (KanR), sítios de origem de replicação COLE1 e F1ORI e o gene ST50 estão indicados no mapa. O tamanho do clone é de 5384 bp.

A figura 2 é um mapa do plasmídeo do clone de ST50 no vetor de expressão pRSETB. O marcador de antibiótico ampicilina (AmpR), o sítio de origem de replicação F1ORI e o gene ST50 estão indicados no mapa. O tamanho do clone é de 4401 bp.

Descrição de Realizações Específicas

Os presentes inventores identificaram e obtiveram pela primeira vez o material genético que codifica a PEM específica de *S. typhi*, que anteriormente era disponível apenas em quantidades limitadas. Uma vez que a PEM 50 kDa é crucial para a detecção de anticorpos IgM e IgG específicos e outras classes de anticorpo, a disponibilidade da proteína em quantidades significativas na forma pura permitirá a elaboração de diagnósticos específicos para a febre tifóide. Adicionalmente, a identificação e o isolamento deste material genético específico permite a produção de novas vacinas para tifóide. Também fornece uma fonte de marcadores de ácido nucléico específicos para uso em técnicas de hibridização que permitem a detecção direta de *S. typhi*. O primeiro resíduo do códon de iniciação predeterminado é designado nucleotídeo 7 e a sequência inteira é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1

sequência de Aminoácido e DNA do Gene de *Salmonella typhi* ST50:

As sequências nucleotídicas estão representadas em tríades com suas posições numeradas. O molde aberto de leitura (ORF) inicia na no nucleotídeo da posição 7 bp com um códon de iniciação "ATG" e termina com um códon de terminação "TGA" no nucleotídeo da posição 1474 bp. O aminoácido codificado pela sequência de DNA é representado abaixo da sequência de DNA com suas posições numeradas. A sequência de sinalização da proteína ST50 é um peptídeo de 16 aminoácidos que inicia no aminoácido da 3ª posição e termina no aminoácido da 18ª posição.

1	ATG CAA ATGAAGAAA TTG CTC CCC ATC CTT ATC GGC CTG AGC CTG	45
1	Met Gln Met Lys Lys Leu Leu Pro Ile Leu Ile Gly Leu Ser Leu	15
46	TCG GGG TTC AGCACA CTA AGCCAGGCAGAGAAC CTG ATG CAA GTT	90
16	Ser Gly Phe Ser Thr Leu Ser Gln Ala Glu Asn Leu Met Gln Val	30
91	TAT CAG CAA GCA CGC CTG AGCAAC CCG GAA TTG CGT AAA TCC GCT	135
31	Tyr Gln Gln Ala Arg Leu Ser Asn Pro Glu Leu Arg Lys Ser Ala	45



136	GCC GAT CGC GAT GCT GCA TTC GAAAAA ATT AACGAAGCG CGT AGT	180
46	Ala Asp Arg Asp Ala Ala Phe Glu Lys Ile Asn Glu Ala Arg Ser	60
181	CCT TTA CTG CCG CAA CTG GGT TTA GGT GCC GAC TAC ACC TAC AGC	225
61	Pro Leu Leu Pro Gln Leu Gly Leu Gly Ala Asp Tyr Thr Tyr Ser	75
226	AACGGT TAT CGC GAT GCG AAC GGT ATC AAC TCC AAT GAA ACC AGC	270
76	Asn Gly Tyr Arg Asp Ala Asn Gly Ile Asn Ser Asn Glu Thr Ser	90
271	GCT TCT CTG CAA TTA ACG CAG ACG CTA TTT GAT ATG TCG AAA TGG	315
91	Ala Ser Leu Gln Leu Thr Gln Thr Leu Phe Asp Met Ser Lys Trp	105
316	CGTGGG CTC ACC CTG CAAGAAAA GCAGCAGGC ATT CAG GAT GTC	360
106	Arg Gly Leu Thr Leu Gln Glu Lys Ala Ala Gly Ile Gln Asp Val	120
361	ACC TAT CAG ACC GAT CAG CAG ACG CTG ATC CTC AAT ACC GCG AAC	405
121	Thr Tyr Gln Thr Asp Gln Gln Thr Leu Ile Leu Asn Thr Ala Asn	135
406	GCG TAT TTT AAG GTA TTG AAC GCT ATT GAT GTG CTT TCC TAT ACC	450
136	Ala Tyr Phe Lys Val Leu Asn Ala Ile Asp Val Leu Ser Tyr Thr	150
451	CAGGCG CAAAAAGAG GCT ATC TAC CGT CAG TTA GAT CAA ACG ACG	495
151	Gln Ala Gln Lys Glu Ala Ile Tyr Arg Gln Leu Asp Gln Thr Thr	165
496	CAA CGT TTT AAC GTG GGT CTG GTC GCC ATT ACC GAC GTG CAA AAC	540
166	Gln Arg Phe Asn Val Gly Leu Val Ala Ile Thr Asp Val Gln Asn	180
541	GCC CGT GCG CAA TAT GAT ACC GTA CTG GCG AAT GAA GTG ACC GCC	585
181	Ala Arg Ala Gln Tyr Asp Thr Val Leu Ala Asn Glu Val Thr Ala	195
586	CGCAACAAC CTG GATAACGCG GTA GAAGAG CTG CGC CAG GTA ACC	630
196	Arg Asn Asn Leu Asp Asn Ala Val Glu Glu Leu Arg Gln Val Thr	210
631	GGCAAT TAT TAC CCG GAG CTG GCG TCG CTT AAC GTC GAG CAT TTT	675
211	Gly Asn Tyr Tyr Pro Glu Leu Ala Ser Leu Asn Val Glu His Phe	225
676	AAA ACC GAC AAA CCC AAA GCT GTT AAT GCG CTG TTG AAG GAA GCG	720
226	Lys Thr Asp Lys Pro Lys Ala Val Asn Ala Leu Leu Lys Glu Ala	240
721	GAA AAC CGT AAC CTG TCG CTG TTG CAG GCG CGT TTA AGT CAG GAT	765

241 Glu Asn Arg Asn Leu Ser Leu Leu Gln Ala Arg Leu Ser Gln Asp 255

766 CTG GCG CGC GAG CAA ATC CGT CAG GCG CAG GAT GGT CAC CTG CCG 810

256 Leu Ala Arg Glu Gln Ile Arg Gln Ala Gln Asp Gly His Leu Pro 270

811 ACG CTG AAT TTA ACG GCC TCA ACC GGC ATT TCT GAT ACC TCT TAT 855

271 Thr Leu Asn Leu Thr Ala Ser Thr Gly Ile Ser Asp Thr Ser Tyr 285

856 AGC GGT TCT AAA ACC AAC TCC ACC CAG TAC GAC GAT AGC AAC ATG 900

286 Ser Gly Ser Lys Thr Asn Ser Thr Gln Tyr Asp Asp Ser Asn Met 300

901 GGG CAG AAT AAA ATC GGC CTT AAC TTC TCC CTG CCG CTG TAT CAA 945

301 Gly Gln Asn Lys Ile Gly Leu Asn Phe Ser Leu Pro Leu Tyr Gln 315

946 GGT GGG ATG GTT AAC TCG CAG GTA AAA CAG GCG CAG TAT AAC TTC 990

316 Gly Gly Met Val Asn Ser Gln Val Lys Gln Ala Gln Tyr Asn Phe 330

991 GTC GGC GCA AGC GAA CAG CTG GAA AGC GCG CAC CGT AGC GTG GTG 1035

331 Val Gly Ala Ser Glu Gln Leu Glu Ser Ala His Arg Ser Val Val 345

1036 CAG ACC GTA CGT TCT TCC TTT AAC AAT ATT AAC GCC TCC ATC AGC 1080

346 Gln Thr Val Arg Ser Ser Phe Asn Asn Ile Asn Ala Ser Ile Ser 360

1081 AGC ATC AAC GCG TAT AAA CAG GCG GTC GTT TCC GCG CAA AGT TCT 1125

361 Ser Ile Asn Ala Tyr Lys Gln Ala Val Val Ser Ala Gln Ser Ser 375

1126 TTG GAT GCC ATG GAA GCC GGT TAC TCG GTC GGT ACA CGT ACC ATT 1170

376 Leu Asp Ala Met Glu Ala Gly Tyr Ser Val Gly Thr Arg Thr Ile 390

1171 GTT GAC GTA CTG GAT GCC ACC ACC ACT CTG TAT GAT GCC AAG CAG 1215

391 Val Asp Val Leu Asp Ala Thr Thr Thr Leu Tyr Asp Ala Lys Gln 405

1216 CAA CTG GCC AAC GCG CGT TAT ACC TAT TTG ATT AAT CAG TTA AAT 1260

406 Gln Leu Ala Asn Ala Arg Tyr Thr Tyr Leu Ile Asn Gln Leu Asn 420

1261 ATC AAA TAT GCG CTC GGT ACG CTG AAC GAG CAG GAT CTG CTC GCG 1305

421 Ile Lys Tyr Ala Leu Gly Thr Leu Asn Glu Gln Asp Leu Leu Ala 435

1306 CTT AAC AGT ACG TTG GGT AAA CCT ATC CCG ACG TCG CCG GAA AGC 1350

436 Leu Asn Ser Thr Leu Gly Lys Pro Ile Pro Thr Ser Pro Glu Ser 450

Fenilalanina (Phe, F)	TTC, TTT
Prolina (Pro, P)	CCA, CCC, CCG, CCT
Serina (Ser, S)	AGC, AGT, TCA, TCC, TCG, TCT
Treonina (Thr, T)	ACA, ACC, ACG, ACT
Triptofano (Trp, W)	TGG
Tirosina (Tyr, Y)	TAC, TAT
Valina (Val, V)	GTA, GTC, GTG, GTT
Sinal de Terminação	TAA, TAG, TGA

53

Outras moléculas de DNA que codificam para tais peptídeos podem prontamente ser determinadas a partir da lista de códons na Tabela 2 e são do mesmo modo contempladas como sendo equivalente a sequência de DNA da Tabela 1. De fato, uma vez que há uma relação fixa entre os códons de DNA e os aminoácidos de um peptídeo, qualquer discussão neste pedido, de uma substituição ou outra modificação num peptídeo, é igualmente aplicável à sequência de DNA correspondente ou a molécula de DNA, vetor recombinante, ou microorganismo transformado no qual a sequência está localizada (e vice-versa).

Em adição, os nucleotídeos específicos listados na Tabela 1, moléculas de DNA (ou RNA correspondente) da invenção podem ter nucleotídeos adicionais precedendo ou sucedendo aqueles que estão especificamente listados. Por exemplo, uma sequência curta (por exemplo, menor do que 20 nucleotídeos) pode ser adicionada ao terminal 3' para fornecer uma sequência terminal correspondente a um sítio de endonuclease de restrição, códons de terminação podem suceder a sequência peptídica para terminar a tradução, e similares. Adicionalmente, as moléculas de DNA contendo uma região promotora ou outra região de controle a montante do gene podem também ser produzidas. Todas as moléculas de DNA contendo as sequências da invenção serão úteis em pelo menos uma proposta uma vez que todas podem ser minimamente fragmentadas para produzir marcadores oligonucleotídicos e serem usadas no isolamento ou detecção de DNA em fontes biológicas.

Um número de palavras usadas na descrição tem significados específicos em adição a seus significados mais comuns. "Equivalente" significa, quando em referência a duas sequências nucleotídicas, que as duas sequências nucleotídicas em questão codificam a mesma sequência de aminoácidos. Quando "equivalente" é usado em referência a dois peptídeos, significa que os dois peptídeos tem uma propriedade comum (tal como atividade antigênica, como estabelecido no contexto). A propriedade não necessita estar presente na

SA

extensão em ambos peptídeos (por exemplo, dois peptídeos podem exibir diferentes reatividades antigênicas), mas as propriedades são preferencialmente substancialmente as mesmas. “Complementaridade”, quando em referência a duas seqüências nucleotídicas, significa que as duas seqüências são capazes de hibridizar, preferencialmente com menos de 25%, mais preferencialmente com menos de 15%, e mesmo mais preferencialmente com menos de 5%, o mais preferível com nenhum emparelhamento inadequado entre os nucleotídeos opostos. Condições preferidas de hibridização (que não estão limitadas a números específicos de emparelhamento inadequado) são estabelecidos nos exemplos. O termo “substancialmente” varia com o contexto conforme compreendido por aqueles versados na arte relevante e geralmente significa no mínimo 70%, preferencialmente significa no mínimo 80%, mais preferencialmente no mínimo 90%, e o mais preferível no mínimo 95%. O termo “isolado” como usado aqui se refere a peptídeo, DNA ou RNA separado de outros peptídeos, DNAs ou RNAs, respectivamente, e sendo encontrado na presença de (se algum) apenas um solvente, tampão, íon ou outro componente normalmente presente numa solução bioquímica do mesmo. “Isolado” não engloba tanto materiais naturais no seu estado nativo quanto materiais naturais que tenham sido separados em componentes (por exemplo, num gel de acrilamida), que não obtidos tanto como substâncias puras quanto como soluções.

Uma vez que a seqüência de DNA do gene foi identificada, é possível produzir um gene de DNA inteiro via química de síntese, após o que o gene pode ser inserido em qualquer dos muitos vetores de DNA disponíveis usando técnicas conhecidas tecnologia de DNA recombinante. Assim, a presente invenção pode ser realizada usando reagentes, plasmídeos, e microorganismos que estão livremente disponíveis e no domínio público no momento do depósito deste pedido de patente sem requerer um depósito de material genético.

Por exemplo, o gene ST50 de 1476 bp pode ser sintetizado numa reação única utilizando oligonucleotídeos específicos de 40 bases estendendo ambas as fitas do gene. Isto pode ser feito pela “técnica PCR de montagem” que foi descrita em detalhes, por exemplo, por Stemmer *et al* 1995, Gene 164; 49-53.

Os peptídeos pode então ser expressos num organismo hospedeiro como aqui descrito. Além disso, equipamento automático também está disponível, que torna a síntese direta de muitos dos peptídeos aqui revelados prontamente disponíveis, especialmente

fragmentos de peptídeo de menos do que a PEM 50 kDa de *S. typhi* inteira. Tal equipamento fornece acesso imediato aos peptídeos da invenção, tanto por síntese direta quanto por síntese de um série de fragmentos que podem ser acoplados utilizando outras técnicas conhecidas.

Em adição a sequência polipeptídica específica mostrada na Tabela 1, fragmentos de peptídeos baseados nesta sequência e fragmentos e sequências de tamanho total que representam variações mínimas desta terão um pouco das atividades biológicas da PEM 50 kDa de *S. typhi* específica e deste modo serão úteis no desenvolvimento de vacinas ou diagnósticos ou outros estudos. Por exemplo, fragmentos da sequência de PEM 50 kDa podem ser prontamente preparados e podem ser selecionados para uso como epítipo para diagnóstico ou para desenvolvimento de vacina de DNA. Sintetizadores de peptídeos podem ser usados para preparar fragmentos pequenos de polipeptídios (por exemplo, menos do que 100 aminoácidos) ou técnicas de engenharia genética podem ser usadas para preparar fragmentos maiores. Pela cromatografia de afinidade de anticorpo usando o anticorpo anti-PEM 50 kDa, peptídeos/epítipos imunogênicos podem ser derivados. Tais peptídeos também podem ser usados (e são de fato mais prováveis de serem usados) como imunógenes para a preparação de anticorpos como padrões em ensaios que utilizam anticorpos de PEM 50 kDa de *S. typhi* como um método para identificar a presença de uma infecção tifóide.

A habilidade em preparar e selecionar fragmentos de peptídeos tendo reatividade imunológica apropriada a partir de uma proteína maior é uma técnica bem conhecida como descrito em numerosas publicações, incluindo patentes. Por exemplo, a patente US No. 4629783, que descreve a preparação de fragmentos imunologicamente ativos de proteínas virais que se ligam aos mesmos anticorpos assim como com a proteína viral inteira.

Em adição, variações mínimas das moléculas de DNA e peptídeos anteriormente mencionadas também são contempladas por serem equivalentes aquelas moléculas de DNA que foram estabelecidas em maiores detalhes, como será apreciado por aqueles versados na arte. Por exemplo, é razoável esperar que uma substituição isolada de uma leucina por uma isoleucina ou valina, um aspartato por um glutamato, uma treonina por uma serina, ou uma substituição similar de um aminoácido por um aminoácido estruturalmente relacionado (isto é, uma substituição conservativa) não apresentará um efeito

maior sobre a atividade biológica da molécula resultante, especialmente se a substituição não envolver um aminoácido num sítio de ligação ou outro sítio de atividade biológica. Isto é particularmente verdade para o gene ST50 em vista das variações significativas conhecidas que existem entre as espécies. Além disto, aminoácidos adicionais podem estar presentes em ambos terminais, ou aminoácidos podem estar ausentes em um ou ambos terminais, como é conhecido no estado da arte. Peptídeos em que mais de uma substituição ocorreu podem prontamente ser testados da mesma maneira. Peptídeos preferidos diferem em não mais do que 12, mais preferencialmente não mais do que 5 aminoácidos em qualquer grupo contíguo de 20 aminoácidos. Substituições de aminoácidos, quando ocorrem são preferencialmente dentro dos grupos de padrão conservativo. Os grupos de aminoácidos de padrão conservativo são mostrados entre parênteses usando o código de aminoácido de uma letra (Tabela 2): não polar (A, V, L, I, P, M); aromático (F, T, W); polar não carregado (G, S, T, C, N, Q); ácido (D, E); básico (K, R, H). Os aminoácidos aromáticos são algumas vezes considerados pertencer aos grupos não polar mais amplo (F, W) ou polar não carregado (T). Contudo, tal proteína modificada é menos útil nos ensaios diagnósticos específicos relativos a identificação de *S. typhi*.

Sais de qualquer dos peptídeos descritos aqui ocorrerão naturalmente quando tais peptídeos estão presentes em (ou isolados de) soluções aquosas de vários pHs. Todos os sais de peptídeos que apresentam a atividade biológica indicada são considerados estar dentro do escopo da presente invenção. Exemplos incluem sais de metais alcalinos, alcalinos terrosos e outros de resíduos de ácido carboxílico, sais de adição ácida (por exemplo, HCl) de resíduos amino e zwitteríons formados por reações entre resíduos de ácido carboxílico e amino dentro da mesma molécula.

Peptídeos da invenção podem ser preparados pela primeira vez como preparações homogêneas livres de material de *Salmonella*, tanto por síntese direta quanto pelo uso de um gene clonado ou um fragmento deste como aqui descrito. PEM 50kDa de *S. typhi* estava anteriormente disponível na forma de um homogeneizado bruto com uma pureza menor que 0,1%. A preparação bruta não estava livre de todas as outras matérias de *S. typhi*. Embora, os genes e proteínas correspondentes possam ser preparados por todas as técnicas sintéticas discutidas acima, nas realizações preferidas da invenção a informação genética é



obtida de fontes naturais e identificadas com aqui descrito. O material genético é primeiro obtido na forma de uma biblioteca genômica, usando qualquer uma das várias técnicas existentes. A primeira destas é clivar randomicamente o DNA genômico e inserir este material clivado em vetores de expressão. Se recombinantes suficientes forem gerados, há uma grande probabilidade de se obter pelo menos um recombinante na população, que expresse a proteína PEM 50 kDa.

Detalhes deste exemplo são estabelecidos abaixo, incluindo detalhes dos experimentos que levam a obtenção da sequência completa do gene. Contudo, não há razões para acreditar que a sequência e o organismo engenheirado específico preparado pelos inventores seja melhor do que quaisquer outros clones que possam ser preparados usando a orientação estabelecida nesta descrição. De fato, é provável que a expressão da proteína PEM 50 kDa possa ser aumentada em relação aquela aqui descrita pela seleção de outros sistemas de expressão.

Agora que a sequência do gene ST50 foi determinada, não há mais necessidade de seguir estes passos para obter os materiais genéticos da presente invenção. A técnica de reação em cadeia com polimerase (PCR) pode agora ser usada para isolar genes a partir de fontes naturais de uma maneira mais simples e mais direta. A técnica PCR, incluindo seus usos em diagnósticos, está revelada na patente US 4683202, que está aqui incorporada como referência. Uma vez que as espécimes estão prontamente disponíveis a partir de fontes tais como "American Type Culture Collection of Rockville (Coleção de Cultura de Tipo Americana de Rockville), Md., e desde que marcadores de PCR podem ser preparados usando as sequências estabelecidas nesta descrição, é possível obter qualquer segmento desejado das sequências aqui estabelecidas usando a técnica PCR fontes comercialmente disponíveis do material genômico de *S. typhi*. Um exemplo específico de tal técnica para isolamento de gene cromossômico de *S. typhi* é descrito nos exemplos que se seguem.

Apesar das técnicas acima estabelecidas, quando usadas em combinação com o conhecimento daqueles versados na arte da engenharia genética e as diretrizes previamente estabelecidas, possibilitarão prontamente o isolamento do gene desejado e seus usos em vetores de DNA recombinante agora que informação suficiente foi provida para localizar o gene, outros métodos que levam ao mesmo resultando são também conhecidos e podem ser

usados na preparação de vetores de DNA recombinante desta invenção.

A expressão de PEM 50kDa pode ser aumentada incluindo cópias múltiplas do gene num hospedeiro transformado; pela seleção de um vetor conhecido para se reproduzir no hospedeiro, produzindo deste modo grandes quantidades da dita proteína a partir do DNA exógeno inserido; ou por qualquer outro meio conhecido de aumento da expressão de peptídeo.

Uma variação comum é a preparação de um polipeptídeo da invenção na forma de um polipeptídeo fundido. Tais peptídeos são tipicamente preparados pelo uso de um plasmídeo vetor com uma região promotora de um gene conhecido para ser expresso e inserir nucleotídeos que codificam toda ou uma porção principal da seqüência de aminoácidos da invenção dentro da seqüência genética. Exemplos de tais proteínas fundidas incluem histidina-tag, beta-galactosidase, proteína de ligação de maltose e proteína verde fluorescente. Se desejado, o peptídeo fundido pode ser montado tal que um sítio reconhecido por uma enzima proteolítica (exemplo: enteroquinase) esteja presente na junção entre as duas proteínas fundidas. A enzima proteolítica pode então ser usada para clivar a proteína expressa tal que a PEM 50 kDa específica de *S. typhi* esteja disponível na forma pura.

Em todos os casos, a proteína PEM 50kDa de *S. typhi* será expressa quando a seqüência de DNA está funcionalmente inserida dentro do vetor. Por “funcionalmente inserida” entende-se na orientação apropriada de leitura da fita, como será compreendido por aqueles versados na arte. Tipicamente, um gene será inserido a jusante de um promotor e será seguido de um códon de terminação, embora a produção como uma proteína híbrida (possivelmente seguida de clivagem) possa ser usada, se desejado.

Em adição aos procedimentos gerais acima que podem ser usados para preparar moléculas de DNA recombinantes e inseridas em organismos unicelulares de acordo com a prática desta invenção, outras técnicas conhecidas e modificações destas podem ser usadas na realização da prática desta invenção. Em particular, técnicas relativas a engenharia genética têm recentemente experimentado crescimento e desenvolvimento explosivo. Muitas patentes Americanas recentes revelam plasmídeos, microorganismos geneticamente engenheirados, e métodos de conduta de engenharia genética, que podem ser usadas na prática da presente invenção. Por exemplo, a patente US No. 4273875 revela um plasmídeo e um processo de



isolamento do mesmo. A patente US No. 4304863 revela um processo para produzir bactéria pela engenharia genética em que um plasmídeo híbrido é construído e usado para transformar um hospedeiro bacteriano, a patente US No. 4419450 revela um plasmídeo útil como um veículo de clonagem em trabalhos de DNA recombinantes. A patente US No. 4362867 revela métodos de construção de cDNA recombinante e nucleotídeos híbridos produzidos deste modo que são úteis nos processos de clonagem. A patente US No. 4403036 revela reagentes genéticos para gerar plasmídeos contendo cópias múltiplas de segmentos de DNA. A patente US No. 4363877 revela vetores de transferência de DNA recombinante. A patente US No. 4356270 revela um veículo de clonagem de DNA recombinante e é uma revelação particularmente útil para aqueles com experiência limitada na área da engenharia genética uma vez que esta define muitos dos termos usados em engenharia genética e os processos básicos aqui usados. A patente US No. 4336336 revela um gene fundido e um método de obtenção do mesmo. A patente US No. 4349629 revela plasmídeos vetores e a produção e uso destes. A patente US No. 4332901 revela um vetor de clonagem útil em DNA recombinante. Embora, algumas destas patentes estejam direcionadas para a produção de um produto gênico particular que não está dentro do escopo da presente invenção, os procedimentos descritos podem facilmente ser modificados para a prática da invenção descrita nesta descrição por aqueles versados na arte da engenharia genética.

As implicações da presente invenção são significativas uma vez que quantidades úteis de PEM 50kDa específica de *S. typhi* e o material genético da invenção ficarão disponíveis para uso no desenvolvimento de ensaios de hibridização ou em qualquer outro tipo de ensaio utilizando estes materiais como um reagente para uso em diagnósticos, imunização, terapêuticos e pesquisa. A transferência do gene ST50 ou partes deste que tenham sido isolados para outros vetores de expressão produzirá construções que melhoram a expressão de PEM 50 kDa específica de *S. typhi* em *E. coli* ou expressam o poliopeptídeo em outros hospedeiros.

Particularmente contemplado é o isolamento de genes a partir de outras cepas de *S. typhi* usando marcadores oligonucleotídicos baseados nas seqüências nucleotídicas variantes e principal aqui reveladas. Tais marcadores podem ser consideravelmente mais curtos do que a seqüência inteira mas devem ter pelo menos 10, preferencialmente pelo menos

14 nucleotídeos de comprimento. Oligonucleotídeos intermediários de 20 a 500, especialmente de 30 a 200 nucleotídeos de comprimento fornecem particularmente marcadores de ação rápida e específica. Oligonucleotídeos mais longos também são úteis, até o comprimento total do gene. Ambos marcadores de DNA e RNA podem ser usados.

5 Normalmente, as sondas são tipicamente marcadas de uma maneira detectável (por exemplo P^{32} , S^{35} , biotina, avidina, fluoresceína ou digoxigenina) e são incubadas com fitas simples de DNA ou RNA a partir de organismos em que um gene está sendo procurado. A hibridização é detectada por meio da desnaturação do marcador do DNA (ou DNA/RNA) de fita dupla (hibridizado) que foi isolado (tipicamente usando papel de nitrocelulose). As técnicas de hibridização adequadas para o uso com oligonucleotídeos são bastante conhecidas.

10 Embora sondas sejam normalmente usadas com um marcador detectável que permite a fácil identificação, oligonucleotídeos não marcados também são úteis, ambos como precursores de sondas marcadas e para uso em métodos que fornecem a detecção direta de DNA (ou DNA/RNA) de fita dupla. Consequentemente, o termo “marcador de oligonucleotídeo” se refere a ambas formas marcadas e não marcadas.

15 Anticorpos monoclonal ou policlonal para a proteína recombinante ST50 podem ser produzidos usando as tecnologias conhecidas. Anticorpos produzidos contra a proteína recombinante ST50 poderiam ser usadas para desenvolver um imunoenensaio de detecção antigênica para a detecção de *S. typhi* ou para uso com outras tecnologias que utilizam anticorpo como um ingrediente. Em adição, partes do DNA ou dos peptídeos ou proteínas derivadas do gene ST50 podem ser usados como um imunogênico em formulações de vacinas para proteger contra as infecções de *S. typhi*. O imunogênico pode ser incorporado em lipossomas, ou conjugado com polisacarídeos e/ou outros polímeros para uso numa formulação de vacina. A sequência de DNA do gene ST50 também pode ser usada para desenvolver uma formulação de vacina de DNA. Muitos métodos podem ser usados por aqueles versados na arte, para introduzir as formulações de vacina em humanos. Estas incluem, mas não estão limitadas a rotas de administração intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutânea, oral e intranasal.

25 Em resumo, o gene ST50 específico de *S. typhi* foi isolado, clonado, sequenciado e expresso em *E. coli*. O molde aberto de leitura deste gene direciona a síntese de

uma proteína de 50.000 Da com similaridades identificáveis a PEM 50 kDa de *S. typhi*. A sequência do gene ST50 inteiro foi de 1476 pares de base (bp) com composições GC e AT de 52,03% e 47,97% respectivamente. O molde aberto de leitura (ORF) inicia no nucleotídeo da posição 7 bp com um códon de iniciação “ATG” e um códon de terminação “TGA” no nucleotídeo da posição 1474 bp. Os aminoácidos preditos do gene ST50 consistiram de 491 aminoácidos. A sequência de sinalização da PEM 50 kDa é um peptídeo de 16 aminoácidos que se estende entre os aminoácidos da 3^a e 18^a posição. A PEM 50 kDa foi expressa em grandes quantidades em *E. coli*, que fornece uma fonte de grandes quantidades de proteína pura para estudos futuros de diagnóstico e vacina.

A PEM 50 kDa expressa foi purificada a homogeneidade por cromatografia IMAC. A reatividade imunológica específica da proteína recombinante ST50 foi avaliada por “Western Blot” e “Dot immuno assay” (imuno-ensaio pontual) ao nível de IgM e IgG. Com a disponibilidade da informação sobre a sequência de DNA, não seria difícil usar a mesma ou partes desta como uma sonda de DNA ou “primer” (iniciador) de PCR para o diagnóstico de tifoide. Esta invenção agora sendo descrita de modo geral, a mesma será melhor compreendida fazendo-se referência aos seguintes exemplos, que são fornecidos como ilustração apenas e não são para ser considerados limitações da invenção a menos quando especificado.

Exemplos

Cepas Bacterianas e Meios

A cepa de *Salmonella typhi* (USM1) foi isolada de um paciente com febre tifoide e tem sido mantida em nosso laboratório desde 1987. Agar de sangue e caldo de nutrientes foi usado para propagar a cepa *S. typhi*. Para os experimentos de biologia molecular a *S. typhi* foi cultivada em meio de cultura Luria.

Isolamento de Proteína Externa de Membrana

PEM parcialmente purificada foi obtida como descrito por Schnaitman *et al* (1971), 108: 553-556. *S. typhi* foi crescida rapidamente em meio nutriente e incubada em um agitador a 37° C por 18 horas até a última fase log (D.O. = 0,8 a 660 nm). As células foram colhidas e suspensas em tampão HEPES 0,01 M (pH 7,4). Células bacterianas foram rompidas em vórtice (vortex) com pérolas de vidro (0,15 mm de diâmetro) por 1,5 h com

alternações de 1 minuto do gelo até 95% de rompimento ter sido obtido como monitorado pela coloração Gram serial. O lisado de células foi aspirado e as pérolas de vidro lavadas com tampão HEPES 0,01 M. Os fragmentos de célula e células não rompidas foram removidas por centrifugação a 5.000g por 15 minutos a 4° C. O fluido sobrenadante foi centrifugado a 200.000g por 1h para obter envelopes de células. A membrana citoplasmática foi removida com HEPES 0,01 M contendo 2% de Triton X-100 e foi deixado depositar por 10 minutos a temperatura ambiente. Isto foi seguido por centrifugação a 200.000g por 1h, 4° C para sedimentar a membrana externa insolúvel. A concentração de proteína de PEM foi determinada por micro-ensaio colorimétrico usando reagente de coloração de ensaio de proteína Bio-Rad (Bio-Rad, Richmond, CA) usando soro albumina bovina como padrão.

Purificação de PEM 50 kDa de *S. typhi*

A PEM 50 kDa de *S. typhi* foi isolada usando eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e eletro-eluição. SDS-PAGE foi realizado sob condições redutoras usando os sistemas descontínuos de tampão (Lammli, 1970) com uma unidade de eletroforese de placa vertical (Bio-Rad). Os géis de empacotamento e separação continham 4,5% e 9% de acrilamida respectivamente. Cada gel de preparação foi carregado com 500 µg de PEM e correu a corrente constante mantida em 25 mA por placa a 4° C por 4 h. As PEMs isoladas foram coradas com Coomassie Blue, e os pesos moleculares foram estabelecidos com marcadores de peso molecular de 14,4-94 kDa.

Para o sequenciamento N-terminal de aminoácidos, a PEM foi corrida em SDS-PAGE e “eletroblotada” sobre membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF). Após coloração com Coomassie Blue, a banda de interesse de 50 kDa foi retirada cuidadosamente e enviada para o sequenciamento de aminoácidos (MidWest Analytical, USA).

Clonagem do Gene ST50

(i) Montagem do “Primer” (iniciador)

A sequência de aminoácidos obtida a partir do sequenciamento N-terminal de aminoácidos da PEM 50 kDa foi analisada. Com base na análise, um par de “primers” de PCR STPCS1-ATG CAA ATG AAG AAA TTG CTC e STR1-TCA ATG CCG GAA TGG ATT GC foram montados para o PCR amplificar o gene ST50.

(ii) Reação em Cadeia com Polimerase (PCR)

DNA genômico de *S. typhi* (USM1) foi extraído pelo protocolo padrão e 50 ng do DNA foram usados como um molde para a amplificação em PCR usando STPS1 e STR1. A amplificação em PCR foi realizada sob as seguintes condições: 200 µg de cada dNTP, 1 X tampão PCR (Tris.Cl 10 mM, KCl 50 mM, pH 8,3), Mg Cl₂ 2,5 mM, 20 pmol de “primer” STPCS1 e STR1, e 1 unidade de TAQ DNA polimerase. O PCR foi realizado num ciclizador térmico Perkin Elmer 9600. A temperatura ótima de enrijecimento de 50° C foi usada para os “primers” se fixarem. Os parâmetros de PCR usados são os seguintes: Desnaturação inicial a 95° C por 5 minutos, seguido de um minuto adicional. Enrijecimento e extensão do “primer” foi realizada a 55° C e 72° C respectivamente por 1 minuto. As etapas foram repetidas por 30 ciclos. Finalmente a temperatura de 72° C foi incluída por 5 minutos como uma extensão final. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose e o tamanho do produto de PCR foi de 1476 bp. Os produtos de PCR foram específicos para *S. typhi* uma vez que os “primers” não amplificam qualquer produto quando DNA genômico de *E. coli* é usado como molde.

(iii) Clonagem em PCR do Gene ST50

O produto amplificado em PCR de 1476 bp do gene ST50 foi clonado num vetor de clonagem PCR (TOPO 2.1, Invitrogen) conforme as instruções do fabricante. Os clones foram selecionados usando um “primer” interno STPR1:GGC CGT TAA ATT CAG CGT CG e o “primer” reverso M13: CAG GAA ACA GCT ATG AC. O mapa do pST50-USM1 clone ST50 é descrito na figura 1.

seqüência do Gene ST50

O sequenciamento do DNA do gene ST50 foi realizada usando pST50-USM1 e M13 -20 na direção CTG GCC GTC GTT TTA C e o “primer” reverso M13 CAG GAA ACA GCT ATG AC através de uma companhia de sequenciamento de DNA comercial (ACGT Inc, USA). A seqüência do gene ST50 inteiro foi de 1476 pares de base (bp) com composições GC e AT de 52,03% e 47,97%. O molde aberto de leitura (ORF) inicia no nucleotídeo de posição 7 bp com um códon de iniciação “ATG” e com um códon de terminação “TGA” no nucleotídeo de posição 1474 bp. O gene ST50 codifica para 491 aminoácidos e o tamanho predito da proteína é de 53682 Daltons. A seqüência de sinalização da proteína ST50 é um peptídeo de 16 aminoácidos que se estende entre o aminoácido da 3^a e 18^a posição. A

seqüência de DNA e a seqüência de aminoácidos predita são dadas na Tabela 1. A presença de seqüências de sinalização indica que esta proteína está localizada na região periplasmática.

Clonagem do Gene ST50 no Vetor de Expressão

Para a expressão do gene ST50, nós escolhemos um sistema de vetor de expressão baseado no promotor T7, vetor pRSETB (Invitrogen). A vantagem do vetor pRSETB é que este contém o promotor T7, que é altamente específico para a RNA polimerase T7.

A transcrição pela polimerase T7 é seletiva e 5 vezes mais rápida do que a RNA polimerase *E. coli* conduzindo assim a expressões mais altas de genes clonados sob o promotor T7. Este vetor também contém uma seqüência nucleotídica que codifica um domínio ligante de metal, uma série de seis aminoácidos histidina consecutivos expressos como fusão N-terminal na proteína de interesse. Este domínio ligante de metal (porções de calda de seis histidinas) no peptídeo de fusão possui alta afinidade por íons divalentes (tipo níquel, cobre e cobalto) e facilita uma etapa de purificação da proteína usando (IMAC) colunas de afinidade de metal imobilizado.

A partir do vetor TOPO o gene ST50 foi retirado usando a enzima de restrição EcoRI. O gene retirado ST50kDa foi ligado no sítio EcoRI do vetor pRSETB. Os clones foram selecionados usando um “primer” interno STPR1: GGC CGT TAA ATT CAG CGT CG e o “primer” terminador T7: GCT AGT TAT TGC TCA GCG G. O mapa do gene ST50 no vetor pRSETB, pST50-USM2, está descrito na figura 2. A presença do gene ST50 no vetor pRSETB foi confirmada pela análise de restrição usando a enzima de restrição Eco RI.

Expressão da Proteína

A expressão protéica da proteína ST50 a partir do clone pST50-USM2 foi realizada na *E. coli* BL21 (DE3) hospedeira. A *E. coli* BL21 (DE3) contém uma cópia cromossômica do gene de RNA polimerase T7 sob o controle do promotor *lac* UV5 e daí a expressão dos genes clonados sob o promotor T7 pode ser induzida por indutor gratuito tal como IPTG. Adicionalmente, BL21 (DE3) sendo uma cepa íon protease deficiente que protege as proteínas heterólogas expressas a partir da clivagem proteolítica. A proteína ST50 foi expressa em *E. coli* BL21 (DE3) após a indução com IPTG.

Resumidamente o seguinte protocolo foi seguido para a expressão das

proteínas recombinantes: (Meio de cultura Luria foi suplementado com 100 µg/mL de ampicilina para o seguinte experimento)

a) *E. coli* BL21 (DE3) foi transformada com o clone pST50-USM2 usando o protocolo mencionado em “(Sambrook *et al* 1989) Molecular Cloning - A laboratory Manual (segunda edição)”, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

b) Uma única colônia transformante fresca foi inoculada em 1,5 mL de LB e crescida por toda a noite (o/n) a 37° C, em condições estática.

c) 50 µL da cultura o/n foi inoculada em 10 mL de LB em 100 mL em frascos cônicos e crescida a 37° C com agitação de 150 rpm, até a cultura alcançar uma D.O.₆₀₀ de 0,6.

d) IPTG foi adicionado a uma concentração final de 1mM e a cultura foi crescida por 3 horas a 37° C com agitação 150 rpm.

e) A cultura foi centrifugada a 10.000g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o depósito de *E. coli* contendo a proteína recombinante foi estocado a -20° C.

A proteína recombinante ST50 foi analisada por SDS-PAGE. O tamanho da proteína recombinante ST50 foi de 59 kDa, que é maior do que a proteína nativa PEM 50kDa, por causa da presença de 52 aminoácidos adicionais derivados do vetor pRSETB.

Purificação da Proteína Recombinante ST50

A purificação da proteína recombinante ST50 foi realizada por cromatografia de afinidade de metal imobilizado (IMAC). IMAC é uma forma especial de cromatografia de afinidade em que um íon metálico imobilizado tal como cobre, zinco ou um íon de metal de transição tal como cobalto ou níquel é usado para ligar a proteína seletivamente pela reação com o grupo imidazol dos resíduos de histidina (Porath *et al.*, 1975). A eluição da proteína pode ser alcançada tanto pelo decréscimo de pH, desestabilizando deste modo o complexo proteína-metal ou usando ligantes competitivos como imidazol ou usando agentes complexantes como EDTA.

No clone pST50-USM2, a proteína recombinante ST50 foi expressa na forma de corpos de inclusão. Deste modo, as proteínas recombinantes ST50 foi solubilizada com uréia 8M e a proteína foi purificada sob condições desnaturantes.

O seguinte protocolo de cromatografia foi seguido para purificar a proteína

recombinante ST50:

A matriz NiNTA adquirida da (Qiagen) e usada na purificação da proteína recombinante ST50. A coluna foi preparada como descrito nas instruções do fabricante. A matriz foi inicialmente equilibrada com o tampão de preparação de coluna (tampão fosfato 0,1M pH 8,0, Tris 0,01M pH 8,0 com uréia 8M). A proteína recombinante ST50 foi solubilizada pelo uso do tampão de lise (tampão fosfato 0,1M pH 8,0, Tris 0,01M pH 8,0 com uréia 8M) por 8 h a 4° C e centrifugado a 12K por 15 minutos para remover os fragmentos. O sobrenadante contendo a proteína recombinante solubilizada foi passado através da coluna e deixado se ligar a esta por 4 horas. A proteína não ligada foi removida pela lavagem da coluna com 5 a 10 volumes de coluna de tampão de preparação (tampão fosfato 0,1M pH 8,0 contendo uréia 8M) até as frações apresentarem zero de A_{280} . A eluição da proteína foi alcançada pelo tampão fosfato 0,1M pH 4,5 contendo uréia 8M. As frações eluídas foram coletadas e a concentração de proteína quantificada pela medida de absorvância a 280 nm. As frações eluídas contendo a proteína foram coletadas e a uréia foi removida por diálise em várias etapas. A análise de SDS-PAGE foi realizada com a lavagem das frações eluídas para verificar a pureza da proteína eluída.

Imuno-reatividade da Proteína Recombinante ST50

(i) Western Blotting

A imuno-reatividade da proteína recombinante ST50 foi analisada por Western blotting. Resumidamente, a proteína recombinante ST50 correu em SDS-PAGE 8%. Após a eletroforese o gel foi incubado por 10 minutos em tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%). Cortes da membrana de nitrocelulose (NCP) do tamanho exato do gel de separação foram incubados por 10 minutos em tampão de transferência. Sem aprisionar bolhas de ar a NCP foi sobreposta ao gel e impressada entre filtros de papel e esponjas "scotch brite". A transferência eletroforética foi realizada numa sala fria a 200 mA por 3 horas usando um aparelho "Transblot" (Bio Rad, USA). Após a transferência, a linha dos marcadores de peso molecular foi cortada e corada com amido black (100 mg de Amido black em metanol 45%, ácido acético 10%). O restante da NCP foi corada com Ponceau S (Ponceau S 0,2%, Sigma, USA, em ácido tricloro acético e 0,3% de ácido sulfosalicílico) para assegurar a transferência das proteínas. A membrana foi lavada em PBS e imobilizada o/n a

4° C com 5% de leite em pó desnatado em PBS.

A NCP foi lavada com tampão de lavagem (PBS) três vezes com 5 minutos de duração cada, e então incubada por toda noite com diluição 1:200 de soro normal coletado, soro tifóide coletado, soro de pacientes com febres comuns a esta região tal como dengue, tifo, paratifo A, B e C. O soro normal coletado foi obtido a partir de 5 indivíduos saudáveis enquanto o soro tifóide coletado foi obtido de pacientes tifóides cujas amostras de sangue foram positiva em cultura. Após a lavagem com tampão de lavagem a membrana foi incubada por 2 horas com peroxidase-conjugada anti-IgM e IgG humano. Após uma lavagem extensiva as bandas foram desenvolvidas usando-se reagente H₂O₂ e 4-cloro-1-naftol por 15 minutos e as bandas foram rinsadas com água destilada para interromper a reação. A proteína recombinante ST50 reagiu especificamente com soros de pacientes com *S. typhi* ao nível dos anticorpos IgG e IgM mas não com soros obtidos de outras infecções.

(ii) Imuno-ensaio de Enzima Pontual

Uma membrana de nitrocelulose de tamanho de poro de 0,45μ (Sistema de Microfiltração, CA, USA) foi usado neste ensaio. Um μL da proteína recombinante ST50 isto é, a proteína foi pingada sobre a nitrocelulose usando uma micro-seringa e deixada secar. As tiras foram mergulhadas no tampão de imobilização (leite desnatado 3%, NaCl 0,9%, Tris-HCl 10 mM, pH 7,4), e colocadas sobre uma placa de agitação por 30 minutos a temperatura ambiente. As tiras imobilizadas foram rinsadas 3 vezes por 15 minutos com tampão NETG (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM e gelatina 0,25%), deixadas secar e mantidas a 4° C até seu uso. A tira foi então marcada com um mL da diluição 1:100 de diferentes amostras de soro e incubada sobre uma placa de agitação por 1 hora a temperatura ambiente. As tiras foram então lavadas 3 vezes por 15 minutos com tampão NETG 1M e ainda incubada sobre uma placa de agitação com a diluição 1:1.600 de anti-IgG humano conjugado com peroxidase (Dalopatts, Glostrup, Denmark) ou diluição 1:800 de anti-IgM humano (Dalopatts, Glostrup, Denmark). Após extensiva lavagem a banda foi desenvolvida usando H₂O₂ e reagente 4-cloro-1-naftol por 15 minutos e a banda foi rinsada com água destilada para interromper a reação. A proteína recombinante ST50 mostrou reatividade específica com soros de pacientes com *S. typhi* ao nível dos anticorpos IgG e IgM enquanto que nenhuma reatividade foi vista nos soros obtidos de outras infecções.

As moléculas isoladas de DNA ou RNA (ST50) da invenção são úteis como fontes de proteção imunológica contra doenças tais como febre tifóide num animal, exemplo, exemplo, um mamífero, exemplo, um homem, em particular como base para uma vacina capaz de provocar uma forte reação imune. Dosagens apropriadas e condições de administração são conhecidas no estado da técnica.

Todas as publicações e pedidos de patentes mencionados neste relatório descritivo são indicativas do nível de experiência daqueles versados na arte a qual esta invenção pertence. Todas as publicações e pedidos de patentes são aqui incorporadas como referência na mesma extensão como se cada publicação ou pedido de patente individual fosse especificamente e individualmente indicado para ser incorporado como referência.

A invenção agora estando completamente descrita, ficará aparente para qualquer técnico versado na arte que muitas modificações e mudanças podem ser feitas aqui sem sair do espírito ou escopo das reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Micro-organismo geneticamente modificado, contendo DNA recombinante, **caracterizado** pelo fato de que o dito DNA recombinante compreende a sequência de DNA que codifica o gene ST50, em que a sequência de DNA SEQ ID No.

5 BD079162 compreende:

1	ATG CAA ATG AAG AAA TTG CTC CCC ATC CTT ATC GGC CTG AGC CTG	45
46	TCG GGG TTC AGC ACA CTA AGC CAG GCA GAG AAC CTG ATG CAA GTT	90
91	TAT CAG CAA GCA CGC CTG AGC AAC CCG GAA TTG CGT AAA TCC GCT	135
136	GCC GAT CGC GAT GCT GCA TTC GAA AAA ATT AAC GAA GCG CGT AGT	180
181	CCT TTA CTG CCG CAA CTG GGT TTA GGT GCC GAC TAC ACC TAC AGC	225
226	AAC GGT TAT CGC GAT GCG AAC GGT ATC AAC TCC AAT GAA ACC AGC	270
271	GCT TCT CTG CAA TTA ACG CAG ACG CTA TTT GAT ATG TCG AAA TGG	315
316	CGT GGG CTC ACC CTG CAA GAA AAA GCA GCA GGC ATT CAG GAT GTC	360
361	ACC TAT CAG ACC GAT CAG CAG ACG CTG ATC CTC AAT ACC GCG AAC	405
406	GCG TAT TTT AAG GTA TTG AAC GCT ATT GAT GTG CTT TCC TAT ACC	450
451	CAG GCG CAA AAA GAG GCT ATC TAC CGT CAG TTA GAT CAA ACG ACG	495
496	CAA CGT TTT AAC GTG GGT CTG GTC GCC ATT ACC GAC GTG CAA AAC	540
541	GCC CGT GCG CAA TAT GAT ACC GTA CTG GCG AAT GAA GTG ACC GCC	585
586	CGC AAC AAC CTG GAT AAC GCG GTA GAA GAG CTG CGC CAG GTA ACC	630
631	GGC AAT TAT TAC CCG GAG CTG GCG TCG CTT AAC GTC GAG CAT TTT	675
676	AAA ACC GAC AAA CCC AAA GCT GTT AAT GCG CTG TTG AAG GAA GCG	720
721	GAA AAC CGT AAC CTG TCG CTG TTG CAG GCG CGT TTA AGT CAG GAT	765
766	CTG GCG CGC GAG CAA ATC CGT CAG GCG CAG GAT GGT CAC CTG CCG	810
811	ACG CTG AAT TTA ACG GCC TCA ACC GGC ATT TCT GAT ACC TCT TAT	855
856	AGC GGT TCT AAA ACC AAC TCC ACC CAG TAC GAC GAT AGC AAC ATG	900
901	GGG CAG AAT AAA ATC GGC CTT AAC TTC TCC CTG CCG CTG TAT CAA	945
946	GGT GGG ATG GTT AAC TCG CAG GTA AAA CAG GCG CAG TAT AAC TTC	990
991	GTC GGC GCA AGC GAA CAG CTG GAA AGC GCG CAC CGT AGC GTG GTG	1035
1036	CAG ACC GTA CGT TCT TCC TTT AAC AAT ATT AAC GCC TCC ATC AGC	1080
1081	AGC ATC AAC GCG TAT AAA CAG GCG GTC GTT TCC GCG CAA AGT TCT	1125

1126	TTG GAT GCC ATG GAA GCC GGT TAC TCG GTC GGT ACA CGT ACC ATT	1170
1171	GTT GAC GTA CTG GAT GCC ACC ACC ACT CTG TAT GAT GCC AAG CAG	1215
1216	CAA CTG GCC AAC GCG CGT TAT ACC TAT TTG ATT AAT CAG TTA AAT	1260
1261	ATC AAA TAT GCG CTC GGT ACG CTG AAC GAG CAG GAT CTG CTC GCG	1305
1306	CTT AAC AGT ACG TTG GGT AAA CCT ATC CCG ACG TCG CCG GAA AGC	1350
1351	GTA GCG CCG GAA ACG CCA GAT CAG GAT GCT GCC GCA GAC GGT TAT	1395
1396	AAT GCT CAT AGC GCC GCG CCA GCA GTA CAG CCG ACC GCC GCT CGC	1440
1441	GCC AAC AGC AAT AAC GGC AAT CCA TTC CGG CAT TGA	1476

2. Micro-organismo geneticamente modificado, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o micro-organismo inclui um vetor de expressão de DNA recombinante que compreende o gene recombinante ST50, em que o gene é posicionado de um lado capaz de ser expresso em uma célula hospedeira.

5 3. Micro-organismo geneticamente modificado, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o micro-organismo é de origem bacteriana, fúngica ou viral.

4. Micro-organismo geneticamente modificado, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o micro-organismo é a *E. Coli* BL21 (DE3).

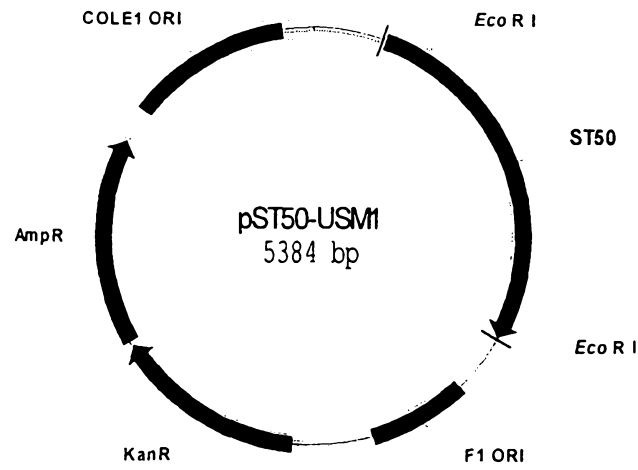
5. Micro-organismo geneticamente modificado, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato de que a *E. Coli* BL21 (DE3) compreende um gene de RNA polimerase T7 sob controle do promotor lac UV5.

6. Micro-organismo geneticamente modificado, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pelo fato de que a *E. Coli* BL21 (DE3) é induzida com β -D-1-tiogalactopiranosídeo de isopropila (IPTG).

7. Micro-organismo geneticamente modificado, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato de que a *E. Coli* BL21 (DE3) é uma cepa deficiente em lon protease.

Jb

Figure 1



27

Figure 2

