

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2008.09.11	(73) Titular(es): INTERVET INTERNATIONAL BV WIM DE KÖRVERSTRAAT 35 5831 AN BOXMEER	NL
(30) Prioridade(s): 2007.09.12 US 971716 P 2007.09.12 US 971726 P 2008.02.26 US 31428		
(43) Data de publicação do pedido: 2010.06.02	(72) Inventor(es): JANE KWUN-LAI BATTLES KIMBERLY D. PROUDFOOT BRENDA L. MEDING PATRICK G. FUNK R. MONTY WARTHEN	US US US US US
(45) Data e BPI da concessão: 2016.08.17 195/2016	(74) Mandatário: VASCO STILLWELL DE ANDRADE RUA CASTILHO, 165 1070-050 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **MÉTODOS DE CULTURA DA ESPÉCIES BACTERIANAS DA FAMÍLIA DAS ANAPLASMATÁCEAS**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A UM MÉTODO DE CULTURA DE ORGANISMOS BACTERIANOS PERTENCENDO À FAMÍLIA ANAPLASMATACEAE EM CÉLULAS EMBRIONÁRIAS OU FETAIS DE MAMÍFEROS. EM PARTICULAR, A PRESENTE INVENÇÃO ESTÁ ORIENTADA AO CRESCIMENTO DE ORGANISMOS BACTERIANOS PERTENCENDO À FAMÍLIA ANAPLASMATACEAE INCLUINDO ORGANISMOS PERTENCENDO AOS GÊNEROS ANAPLASMA, EHRLICHIA E NEORICKETTSIA. OS ORGANISMOS BACTERIANOS PODEM SER CULTIVADOS EM CÉLULAS HOSPEDEIRAS EMBRIONÁRIAS OU FETAIS DE MAMÍFEROS INCLUINDO CÉLULAS HOSPEDEIRAS EMBRIONÁRIAS DE FELINOS. O MATERIAL BACTERIANO CULTIVADO DE ACORDO COM OS MÉTODOS DESCRITOS NO PRESENTE DOCUMENTO PODE SER UTILIZADO COMO A BASE PARA VACINAS CONTRA DOENÇAS ASSOCIADAS COM AS BACTÉRIAS ANAPLASMATACEAE, OU COMO A BASE PARA APLICAÇÕES DE DIAGNÓSTICO ÚTEIS PARA O DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS ASSOCIADAS COM AS BACTÉRIAS ANAPLASMATACEAE.

RESUMO

MÉTODOS DE CULTURA DA ESPÉCIES BACTERIANAS DA FAMÍLIA DAS ANAPLASMATÁCEAS

A presente invenção refere-se a um método de cultura de organismos bacterianos pertencendo à família *Anaplasmataceae* em células embrionárias ou fetais de mamíferos. Em particular, a presente invenção está orientada ao crescimento de organismos bacterianos pertencendo à família *Anaplasmataceae* incluindo organismos pertencendo aos gêneros *Anaplasma*, *Ehrlichia* e *Neorickettsia*. Os organismos bacterianos podem ser cultivados em células hospedeiras embrionárias ou fetais de mamíferos incluindo células hospedeiras embrionárias de felinos. O material bacteriano cultivado de acordo com os métodos descritos no presente documento pode ser utilizado como a base para vacinas contra doenças associadas com as bactérias *Anaplasmataceae*, ou como a base para aplicações de diagnóstico úteis para o diagnóstico de doenças associadas com as bactérias *Anaplasmataceae*.

DESCRIÇÃO

MÉTODOS DE CULTURA DA ESPÉCIES BACTERIANAS DA FAMÍLIA DAS
ANAPLASMATÁCEAS

CAMPO DA INVENÇÃO

A descrição descreve um método de cultura de organismos bacterianos pertencendo à família *Anaplasmataceae* em células embrionárias ou fetais de mamíferos, tais como células embrionárias ou fetais de felino. Em particular, a presente descrição descreve o crescimento de organismos bacterianos pertencendo à família *Anaplasmataceae* incluindo organismos pertencendo ao género *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia*, e *Wolbabachiae*. Os organismos bacterianos podem ser cultivados em células embrionárias ou fetais de mamíferos, tais como células hospedeiras embrionárias ou fetais de felino. O material bacteriano cultivado de acordo com os métodos descritos no presente documento pode ser utilizado como a base para vacinas contra doenças associadas com as bactérias *Anaplasmataceae*.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

As bactérias da família *Anaplasmataceae* são parasitas intracelulares obrigatórios. Como tal, estes microrganismos são frequentemente difíceis de cultivar e as doenças que causam são difíceis de diagnosticar. Devido à dificuldade de crescimento destes microrganismos, a preparação a grande escala de antigénios para vacinas é dispendiosa e algumas vezes impossível. As bactérias da família *Anaplasmataceae* são agentes patogénicos de doenças transmitidas por vetor de seres humanos e animais. São principalmente transmitidas através de vetores invertebrados tais como carraças. Dentro da família *Anaplasmataceae*, os microrganismos dos géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia* e *Wolbachieae* são agentes causantes de doenças transmitidas por vetor e são

difíceis de cultivar, especialmente a grande escala. As espécies bacterianas pertencendo ao género *Rickettsia* não estão incluídas dentro da família *Anaplasmataceae*.

A anaplasmosose é uma doença portada por carrças principal de gado endémico nos Estados Unidos. O agente causante, *Anaplasma marginale*, invade e multiplica-se nos eritrócitos do gado, causando anemia leve a grave. A mortalidade e morbidade anuais devido a anaplasmosose impactando os rebanhos de gado de corte causou prejuízo no valor de milhões de dólares devido a, por exemplo; perda de peso durante infeções agudas e custos veterinários aumentados. Veja-se, por exemplo, Palmer em *Veterinary Protozoan and Hemoparasite Vaccines*, J.G. Wright (Ed.) CRC Press Inc., Boca Raton, Fla. 1989.

Anaplasma phagocytophilum causa febre portada por carrças em ovelhas, gado, e bisões, e tem como vetor *I. ricinus*. Veja-se a Patente U.S. N.º 6.284.238, que é totalmente incorporada por referência no presente documento. Em contraste com *A. marginale* que infeta os glóbulos vermelhos, *A. phagocytophilum* infeta granulócitos.

As bactérias *Ehrlichia* estão estreitamente relacionadas com a espécie *Anaplasma*. Aquelas espécies para as quais é conhecido um vetor biológico são transmitidas por carrças, tais como para *E. canis*. Enquanto *Anaplasma phagocytophilum* prefere infetar granulócitos no seu hospedeiro mamífero, *Ehrlichia canis* prefere infetar glóbulos brancos mononucleares. Tipicamente, *Anaplasma* e *Ehrlichia* estão contidas dentro de vacúolos ligados a membrana das suas respectivas células hospedeiras.

A primeira espécie de *Ehrlichia* reconhecida foi *E. canis*. Ocorre em todas as áreas do mundo onde a carrça vetor, *Rhipicephalus sanguineus* (a carrça castanha do cão), vive. A doença que causa é algumas vezes denominada pancitopenia tropical canina. É um problema especialmente em todas as áreas quentes do mundo, por exemplo, o sul dos

E.U.A., América Central e do Sul, o Mediterrâneo, e o Sul da Ásia. *Ehrlichia canis* pode ser cultivada na linha celular de cão DH82 bem como em linhas celulares híbridas humano-cão (Veja-se Rikihisa, Y. 1991. *Clinical Microbiology Reviews*, 4:286). São listadas várias estirpes de *E. canis* no Pedido de Patente U.S. N.º 2006/0188524. *Ehrlichia chaffeensis* é associada com a erliquiose humana. Veja-se Maeda, K. et al., 1987, *N. Engl. J. Med.* 316:853; Dawson, J. E. et al., 1991, *J. Clin. Microbiol.* 29:2741. *E. chaffeensis* pode também ser cultivada em células DH82.

As bactérias *Neorickettsia* estão estritamente relacionadas com bactérias *Ehrlichia* e *Anaplasma*. As espécies de *Neorickettsia* incluem *N. risticii* e *N. sennetsu* (das quais ambas foram previamente classificadas no género *Ehrlichia*). *N. risticii* é o agente causante da febre equina do Potomac. Esta doença é conhecida como ocorrendo na América do Norte, França e Índia. *N. risticii* pode ser cultivada em linhas celulares de macrófagos-monócitos tais como P388D1, T-84 e U937. *N. sennetsu* é o agente causante da erliquiose de Sennetsu em seres humanos. *N. sennetsu* cresce nas linhas celulares de ratinho e humanas P388D, L929, e HeLa.

Podem ser diagnosticadas infeções com organismos bacterianos da família *Anaplasmataceae* através de exame microscópico direto e/ou serodiagnóstico. O tratamento com antibióticos pode ser eficaz. Estão comercialmente disponíveis vacinas equinas para proteção contra *N. risticii*. Veja-se *Compendium of Veterinary Products*, 6ª ed., Aurora Arrioja, ed., North American Compendiums, Ltd., Port Huron, MI (2001). Também está comercialmente disponível pelo menos uma vacina para gado para proteção contra a anaplasmoze. Veja-se *Id* Contudo, não foram fabricadas e vendidas vacinas para prevenção a grande escala de outras doenças causadas por organismos bacterianos tais como, por exemplo. *E. canis*. Atualmente,

acredita-se que não existem vacinas comerciais para *Ehrlichia canis*.

Foram realizados esforços para cultivar determinados organismos *Rickettsiales* numa variedade de células hospedeiras. A Patente U.S. N° 5.192.679, refere-se à propagação contínua de *E. canis* numa linha celular de macrófagos monócitos caninos DH82 num meio *in vitro* que sustenta o crescimento de células DH82. O Pedido U.S. Publicado N.° 2005/0202046 refere-se a vacinas de *E. canis* onde *E. canis* foi cultivado em células DH82. A Patente U.S. N° 5.401.656, refere-se à propagação de *E. chaffeensis* e *E. canis* numa linha celular endotelial humana imortalizada. A Patente U.S. N.° 5.869.335, refere-se à cultura de determinadas bactérias *Rickettsiales* em linhas celulares de *Ixodes scapularis*. A Patente U.S. N° 5.989.848, refere-se ao crescimento de determinadas espécies de *Ehrlichia* numa linha celular endotelial humana imortalizada. A Patente U.S. N° 3.616.202, refere-se ao crescimento de *Anaplasma marginale* numa cultura de tecido de medula óssea de coelho. O Pedido de Patente U.S. Publicado N.° 2006/0057699, refere-se ao crescimento de determinadas espécies de *Anaplasma* em células de mamíferos. O Pedido de Patente U.S. Publicado N.° 2003/0003508, refere-se à cultura da bactéria *Rickettsia pulicis* numa linha celular de *Xenopus laevis*. As Patentes U.S. N.° 5.955.359 e 5.976.860, referem-se à cultura de determinadas espécies bacterianas pertencendo à ordem *Rickettsiales* em determinadas linhas celulares de mamíferos. A Patente U.S. N° 5.877.159, refere-se a métodos para introduzir e expressar genes em células animais utilizando determinados vetores bacterianos invasivos vivos.

Foi enviada uma tese discutindo a imunização de cães contra a erliquiose canina utilizando organismos de *Ehrlichia canis* inativados (Sunita Mahan, Immunisation of German shepherd dogs against canine ehrlichiosis using

inactivated Ehrlichia canis organisms, tese enviada à Faculdade de Ciências Veterinárias da Universidade do Zimbabwe (maio de 1997)). Esta tese discute a utilização de um organismo de *E. canis* inativado por β -propiolactona em combinação com Quill A.

Já que o crescimento de espécies bacterianas pertencendo à família Anaplasmataceae em células hospedeiras foi alcançado somente com êxito limitado e aparentemente não se traduziu num fornecimento abundante de vacinas, permanece uma necessidade geral de desenvolvimento de sistemas de cultura para o crescimento de tais espécies bacterianas para facilitar o estudo destes microrganismos patogênicos e para o desenvolvimento de vacinas para proteção contra as doenças que causam. Existe também uma necessidade de desenvolver um sistema de cultura a grande escala para a preparação de grandes quantidades de antigénio a partir de tais microrganismos para utilização em diagnósticos e vacinas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A descrição descreve a cultura de organismos bacterianos pertencendo à família *Anaplasmataceae* em células hospedeiras embrionárias ou fetais de mamíferos. Os organismos bacterianos cultivados podem ser utilizados como uma vacina contra doenças causadas por parte dos organismos bacterianos. O antigénio utilizado na vacina pode ser fabricado a partir dos organismos bacterianos isolados a partir das células hospedeiras de mamíferos. Alternativamente, o antigénio utilizado na vacina pode ser fabricado a partir de culturas das células hospedeiras de mamíferos infetadas com os organismos bacterianos. Os organismos bacterianos (ou a célula hospedeira se presente) podem ser inativados. Alternativamente, os organismos bacterianos podem ser atenuados vivos de tal forma a ser replicados dentro de um animal ao qual são administrados uma ou mais vezes sem causar o estado de doença típico da

forma patogénica não atenuada do organismo bacteriano.

Com maior particularidade, a descrição descreve a cultura de organismos bacterianos da família *Anaplasmataceae* em célula hospedeiras que são células embrionárias de mamíferos. Numa forma de realização da descrição, as bactérias são cultivadas em células de mamífero embrionárias não humanas. Tais células hospedeiras podem ser obtidas a partir de qualquer parte de um embrião ou feto animal não humano. Tais células hospedeiras podem ser diferenciadas ou não diferenciadas. As células hospedeiras embrionárias podem ser derivadas a partir de embriões ou fetos felinos, caninos, de ratinho, suínos, bovinos, ovinos, de símios ou equinos. Numa forma de realização da invenção, as células hospedeiras embrionárias são derivadas a partir de embriões ou fetos felinos.

Os organismos bacterianos da família *Anaplasmataceae* pertencem aos géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia* ou *Neorickettsia*. Os organismos bacterianos pertencendo à família *Anaplasmataceae* não incluem aqueles organismos bacterianos pertencendo à família *Rickettsiaceae*. (A família *Rickettsiaceae* inclui o género *Rickettsiae*, que inclui as espécies *R. orientia* e *R. rickettsia*). Os organismos bacterianos específicos pertencendo ao género *Anaplasma* podem ser *A. bovis*, *A. centrale*, *A. marginale*, e *A. phagocytophilum*. O organismo bacteriano específico pertencendo ao género *Ehrlichia* pode ser *E. canis*. O organismo bacteriano específico pertencendo ao género *Neorickettsia* pode ser *N. risticii*.

A descrição descreve um método de cultura de uma espécie bacteriana a partir da família *Anaplasmataceae* compreendendo: i) obter espécies bacterianas a partir da família *Anaplasmataceae*; ii) infetar células embrionárias de mamífero não humano com as ditas espécies bacterianas; e iii) cultivar as ditas células embrionárias de mamífero não humano sob condições favoráveis à propagação das células

embrionárias de mamífero não humano, cultivando como tal as espécies bacterianas. A espécie bacteriana pode ser obtida num estado purificado isento de qualquer célula hospedeira, num estado onde está presente numa célula hospedeira, num estado onde está presente num homogenado de tecido animal infetado. Numa forma de realização, as células embrionárias de mamífero não humano são infetadas com um homogenado de células de mamífero isoladas a partir de um animal infetado com um organismo de *Anaplasmataceae*. Noutra forma de realização, as células embrionárias de mamífero não humano são infetadas através da exposição das células embrionárias a um organismo de *Anaplasmataceae*. A espécie bacteriana de *Anaplasmataceae* pode ser dos géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia* ou *Neorickettsia*. A espécie bacteriana de *Anaplasmataceae* pode ser *Anaplasma bovis*, *Ehrlichia canis*, ou *Neorickettsia risticii*. Numa forma de realização, as células embrionárias de mamífero não humano são células de felino. As células de felino podem ser células fibroblásticas embrionárias de felino, células embrionárias de felino FEA, ou células fetais inteiras de *Felis catus*. As células embrionárias de mamíferos não humanos podem ser indiferenciadas e/ou imortalizadas. Noutra forma de realização, as células embrionárias de mamíferos não humanos são células epiteliais renais embrionárias de macaco.

A descrição também descreve composições compreendendo células embrionárias de mamíferos não humanos infetadas com uma espécie bacteriana a partir da família *Anaplasmataceae*. As espécies bacterianas podem ser dos géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia* ou *Neorickettsia*. As espécies bacterianas de *Anaplasmataceae* podem ser quaisquer conhecidas para o perito na especialidade incluindo, sem limitação, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, ou *Neorickettsia risticii*. As células embrionárias de mamíferos não humanos podem ser células fibroblásticas embrionárias de felino (FEF), células embrionárias de

felino FEA, ou células fetais inteiras de *Felis catus*. As células embrionárias de mamíferos não humanos podem ser indiferenciadas e/ou imortalizadas. As células embrionárias de mamíferos não humanos podem também ser células epiteliais renais embrionárias de macaco.

A descrição também descreve métodos de prevenção de infecção num mamífero através da administração ao mamífero de uma vacina com base em material cultivado de acordo com os métodos descritos no presente documento. A descrição também descreve métodos de proteção de um mamífero através da administração ao mamífero de uma vacina com base em material cultivado de acordo com os métodos descritos no presente documento. A descrição também descreve métodos de tratamento de um mamífero através da administração ao mamífero de uma vacina com base em material cultivado de acordo com os métodos descritos no presente documento. Em particular, a descrição também descreve a proteção de um mamífero contra uma doença causada por um organismo pertencendo à família *Anaplasmataceae* proporcionando ao mamífero uma quantidade terapêuticamente eficaz de um antigénio bacteriano *Anaplasmataceae*. O mamífero pode ser um ser humano, macaco, gato, cão, cavalo, vaca, porco, ovelha ou cabra. Numa forma de realização da invenção, o animal é um cão.

A descrição também descreve a administração a um mamífero de uma quantidade imunologicamente protetora de material cultivado de acordo com os métodos descritos no presente documento; ou a administração a um mamífero de uma quantidade eficaz de material cultivado de acordo com os métodos descritos no presente documento para produzir uma resposta imune.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A menos que estabelecido de outro modo todos os termos utilizados no presente documento têm o seu significado comum conforme seria entendido por parte do

perito na especialidade. Os termos para os quais são proporcionadas abaixo definições explícitas têm adicionalmente ao seu significado explícito o significado tipicamente adscrito por parte do perito na especialidade.

A presente invenção refere-se a um método de cultura contínua de *Ehrlichia canis* em células fibroblásticas embrionárias de felino. A presente divulgação refere-se a métodos de cultura de microrganismos. Mais particularmente, a presente invenção refere-se a métodos de crescimento de organismos bacterianos pertencendo à família *Anaplasmataceae*. Mais particularmente, a presente invenção refere-se a crescimento contínuo de organismos bacterianos pertencendo aos géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia* ou *Neorickettsia*.

Exemplos não limitantes de espécies pertencendo ao género *Anaplasma* que podem ser utilizados de acordo com a presente divulgação incluem *A. bovis*, *A. centrale*, *A. marginale*, *ovis*, *A. platys* e *A. phagocytophilum* (previamente referidos como *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi*, agente da erliquiose granulocítica humana ou agente HGE). Exemplos não limitantes de espécies pertencendo ao género *Ehrlichia* que podem ser utilizados de acordo com a presente invenção incluem *E. canis*, *E. chaffeensis*, e *E. muris*. Exemplos não limitantes de espécies pertencendo ao género *Neorickettsia* que podem ser utilizados de acordo com a descrição incluem *N. helminthoeca*, *N. risticii* (febre equina do Potomac, anteriormente denominado *E. risticii*), e *N. sennetsu*.

De acordo com a descrição, os organismos bacterianos da família *Anaplasmataceae* são cultivados em células hospedeiras embrionárias ou fetais de mamíferos. Conforme utilizado no presente documento, "células hospedeiras" são células que os organismos bacterianos da família *Anaplasmataceae* podem infetar e nas quais os organismos bacterianos se podem replicar. Exemplos não limitantes de

células hospedeiras embrionárias ou fetais de mamíferos incluem células embrionárias ou fetais humanas, felinas, caninas, de ratinho, suínas, bovinas, ovinas, de símios ou equinas. Conforme utilizado no presente documento, "células hospedeiras infetadas" refere-se a células hospedeiras que contêm uma ou mais bactérias de *Anaplasmataceae*.

As células hospedeiras podem ser derivadas a partir de uma única célula isolada a partir de tecido embrionário ou fetal de mamíferos. Por exemplo, as células podem ser derivadas a partir de tecido embrionário felino, canino, bovino, equino, de ratinho, suíno, de símio ou humano.

Numa forma de realização da descrição, espécies bacterianas pertencendo às *Anaplasmataceae* são cultivadas em células hospedeiras que são derivadas a partir de tecido embrionário ou fetal de mamífero não humano. Um exemplo não limitante de células embrionárias ou fetais de felino que podem ser utilizadas de acordo com a presente invenção incluem células fibroblásticas embrionárias de felino (FEF), células embrionárias de felino FEA (Universidade de Glasgow, Glasgow, Escócia; conforme descrito em Jarret, O. *et al.*, J. gen. Virol. 20:169-175 (1973)), e células fetais inteiras de *Felis catus* (FCWF-4, American Type Culture Collection. P.O. Box 1549 Manassas, VA 201 Q8, Estados Unidos (doravante, "ATCC") depósito CRL-2787).

Os organismos bacterianos cultivados de acordo com a presente invenção podem ser utilizados para vacinas, diagnósticos ou pesquisa adicional incluindo, por exemplo, produção de quantidades de moléculas biológicas para isolamento e estudo. Conseqüentemente, as bactérias cultivadas de acordo com a presente invenção podem ser formuladas numa vacina para administração a um mamífero para prevenir infecção ou melhorar doenças causadas por parte do organismo bacteriano. Por exemplo, as bactérias cultivadas nas células hospedeiras poderiam ser *Ehrlichia canis* para utilização numa vacina a ser administrada a

caninos para prevenir ou melhorar a erliquiose canina.

Como tal, a descrição também descreve composições ou vacinas imunogênicas com base em material cultivado de acordo com a presente invenção. O agente terapêutico (também referido como o antigênio, agente ativo, ou a composição imunogênica) que pode servir como a base para uma vacina pode ser um ou mais dos seguintes:

- a) culturas colhidas de células hospedeiras que são infetadas com bactérias *Anaplasmataceae*;
- b) extratos ou frações de (a) que são potenciadas relativamente à concentração das bactérias *Anaplasmataceae* contidas dentro das células hospedeiras infetadas;
- c) Extratos potenciados com bactérias *Anaplasmataceae* de (a) que contêm vestígios das células hospedeiras;
- d) Extratos de bactérias *Anaplasmataceae* de (a) que não contêm vestígios das células hospedeiras ou
- e) Agentes imunogênicos bacterianos de *Anaplasmataceae* isolados.

"Isolados" quando utilizado no presente documento significa removido a partir do seu ambiente de ocorrência natural. Como tal, as células bacterianas *Anaplasmataceae* isoladas incluem amplamente aquelas que foram removidas a partir dos seus ambientes de ocorrência natural, cujos ambientes podem incluir artrópodes, insetos ou mamíferos infetados vivos ou mortos inteiros. As células bacterianas *Anaplasmataceae* isoladas incluem aquelas que são contidas dentro de tecido de mamíferos que foi removido a partir de um mamífero infetado por bactérias *Anaplasmataceae*. As células bacterianas *Anaplasmataceae* isoladas também incluem aquelas que estão completamente ou parcialmente separadas de células de mamíferos de um mamífero infetado por bactérias *Anaplasmataceae*, tal como a partir da lise das células hospedeiras, infetado por bactérias *Anaplasmataceae* também incluem aquelas que são contidas dentro de células

hospedeiras conforme descrito no presente documento, ou separadas parcialmente ou completamente a partir das mesmas. As células bacterianas *Anaplasmataceae* isoladas também incluem aquelas que estão substancialmente isentas de outros microrganismos, por exemplo, numa cultura.

"Isoladas" conforme utilizado em "agentes imunogénicos bacterianos de *Anaplasmataceae* isolados" refere-se a agentes imunogénicos bacterianos que foram completamente ou parcialmente separados a partir da sua respetiva fonte de bactérias *Anaplasmataceae*. Composições de agentes imunogénicos bacterianos de *Anaplasmataceae* isolados podem incluir algumas bactérias *Anaplasmataceae* intatas inteiras, porções ou componentes de bactérias *Anaplasmataceae*, células hospedeiras intatas inteiras, e/ou porções ou componentes de células hospedeiras. Os agentes imunogénicos bacterianos de *Anaplasmataceae* isolados também incluem composições que são enriquecidas relativamente a uma ou mais biomoléculas bacterianas de *Anaplasmataceae*.

"Agentes imunogénicos bacterianos de *Anaplasmataceae*" conforme utilizado no presente documento inclui bactérias *Anaplasmataceae* inteiras que são bactérias vivas inativadas ou modificadas. Um agente imunogénico de *Anaplasmataceae* conforme utilizado no presente documento pode também incluir proteínas (lipoproteínas, proteínas membranosas, proteínas citosólicas), fragmentos imunogénicos de tais proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, sacarídeos, lipopolissacarídeos ou outras moléculas biológicas derivadas a partir das bactérias *Anaplasmataceae*. O agente imunogénico bacteriano de *Anaplasmataceae* pode ser células bacterianas de *Anaplasmataceae* inteiras ou partes das mesmas que estão presentes em células hospedeiras, em que tanto as células bacterianas como hospedeiras são mortas ou inativadas. O agente imunogénico bacteriano de *Anaplasmataceae* pode também ser células bacterianas de *Anaplasmataceae* inteiras ou partes das mesmas que estão

presentes em células hospedeiras, em que as células bacterianas ou hospedeiras não são mortas ou inativadas.

O perito na especialidade está geralmente familiarizado com as técnicas através das quais as células bacterianas ou hospedeiras podem ser mortas ou inativadas. Tais técnicas incluem, meios físicos, químicos e biológicos. Exemplos não limitantes de técnicas de inativação incluem sonicação, técnicas de congelamento e descongelamento, pressão, tratamento com calor, químicos ou enzimas. Exemplos não limitantes de agentes de inativação química incluem tratamento com etilenamina binária (BEA) e formalina (solução de formaldeído).

Conforme afirmado acima, o material cultivado de acordo com a presente invenção pode ser utilizado para fabricar antigénio para vacinas. Conforme utilizado no presente documento, o termo "vacina(s)" significa e refere-se a um produto, cuja administração pretende eliciar uma resposta imune que possa prevenir e/ou reduzir a gravidade de uma ou mais doenças infecciosas. Uma vacina contém um antigénio (ou, "agente ativo", "agente imunogénico", "agente terapêutico", ou "composição imunogénica") que pode ser material cultivado de acordo com a presente invenção incluindo uma célula hospedeira infetada com bactérias *Anaplasmataceae*, bactérias *Anaplasmataceae* intatas inteiras, ou frações ou partes ou biomoléculas bacterianas de uma bactéria *Anaplasmataceae* que atuam para estimular o sistema imune num animal. Um antigénio pode ser uma preparação viva atenuada ou morta de células hospedeiras infetadas com bactérias *Anaplasmataceae*, bactérias *Anaplasmataceae* vivas atenuadas ou mortas, células irradiadas vivas, frações em bruto ou agentes imunogénicos bacterianos de *Anaplasmataceae*. Como tal, uma vacina pode compreender antigénios enriquecidos, isolados ou purificados. As vacinas podem ser formadas a partir de culturas inativadas ou mortas de células hospedeiras

infetadas com *Anaplasmataceae*, ou bactérias *Anaplasmataceae* inativadas ou mortas.

Uma vacina pode também compreender uma combinação de antigénios a partir de mais de uma espécie bacteriana de *Anaplasmataceae* ou a partir de outros agentes patogénicos (por exemplo víricos, parasíticos bacterianos ou fúngicos) conforme descrito mais abaixo.

As vacinas fabricadas a partir de material cultivado de acordo com a presente invenção compreendem uma quantidade terapêuticamente eficaz do antigénio. No contexto desta invenção, uma "quantidade terapêuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade de um antigénio ou vacina que induziria uma resposta imune num mamífero recebendo o antigénio ou vacina que é adequado para prevenir ou melhorar sinais ou sintomas de doença, incluindo efeitos adversos para a saúde ou complicações dos mesmos, causados por uma infeção com uma bactéria *Anaplasmataceae* patogénica. A imunidade humoral ou imunidade mediada por células ou imunidade tanto humoral como mediada por células podem ser induzidas. A resposta imunogénica de um animal a uma vacina pode ser avaliada, por exemplo, indiretamente através da medição de títulos de anticorpos, através de análise microscópica, ou diretamente através da monitorização de sinais e sintomas após desafio com estirpes de tipo selvagem. A imunidade protetora conferida através de uma vacina pode ser avaliada através de medição, por exemplo, redução dos sinais clínicos tais como mortalidade, morbilidade, temperatura corporal e condição física global e saúde e desempenho global do indivíduo. A quantidade de uma vacina que é terapêuticamente eficaz pode variar dependendo do vírus particular utilizado, ou da condição do indivíduo, e pode ser determinada por parte de um perito na especialidade.

O material cultivado de acordo com a presente invenção pode também ser utilizado para fabricar composições

imunogénicas que estimulam uma resposta imune num indivíduo mamífero ao qual as composições são administradas. Tais composições podem ser utilizadas para identificar antigénios que podem servir como a base de uma vacina. Consequentemente, por exemplo, podem ser administradas composições imunogénicas compreendendo material cultivado de acordo com a presente invenção a um indivíduo mamífero. Posteriormente, o título de anticorpos do indivíduo mamífero pode ser monitorizado e podem ser selecionados antigénios bacterianos de *Anaplasmataceae* candidatos para utilização ou estudo adicional em vacinas. As composições imunoativas da presente invenção incluem composições que estimulam uma resposta imune humoral e/ou uma resposta imune mediada por células no indivíduo recebendo uma vacina.

Conforme utilizado no presente documento, uma "resposta imune" refere-se à resposta de imunidade ativa do indivíduo mamífero devido a ter recebido uma ou mais vacinas com base no material cultivado de acordo com os métodos descritos no presente documento. A resposta imune pode incluir a produção de um ou mais anticorpos em resposta ao antigénio ou agente imunogénico presente na vacina. "Resposta imune" num indivíduo refere-se ao desenvolvimento de uma resposta imune humoral, uma resposta imune celular, ou uma resposta imune humoral e uma celular a um antigénio. Podem ser determinadas respostas imunes utilizando ensaios imunológicos e ensaios de neutralização padrão, que são conhecidos na técnica.

Podem ser utilizadas vacinas fabricadas a partir de material cultivado de acordo com a presente invenção para prevenir infeções num indivíduo mamífero, proteger um indivíduo mamífero, ou tratar um indivíduo mamífero.

"Prevenir infeções" e termos semelhantes significa prevenir ou inibir a replicação das bactérias que causam a doença identificada, inibir a transmissão das bactérias ou

vírus, ou prevenir que as bactérias se estabeleçam no seu animal hospedeiro, ou aliviar os sintomas da doença causada pela infecção. O tratamento é considerado terapêutico se existir uma redução da carga bacteriana.

"Proteção", "Proteger", e semelhantes, conforme utilizado relativamente a uma bactéria, significa que a vacina previne ou reduz os sintomas da doença causada por parte do organismo a partir do qual o(s) antigénio(s) utilizado(s) na vacina é(são) derivado(s). Os termos "proteção" e "proteger" e semelhantes, significam também que a vacina pode ser utilizada para "tratar" a doença ou um ou mais sintomas da doença que já existe(m) num indivíduo.

"Tratar" refere-se a reverter, aliviar, inibir o progresso de, ou prevenir um distúrbio, condição ou doença à qual se aplica tal termo, ou a prevenir ou um ou mais sintomas de tal distúrbio, condição ou doença. Tratar também se refere a acelerar a recuperação de uma infecção a partir de um ou mais organismos de *Anaplasmataceae*. "Tratamento" refere-se ao ato de tratar.

Como tal, podem ser utilizadas vacinas fabricadas a partir de material cultivado de acordo com a presente invenção para prevenir infeções bacterianas de *Anaplasmataceae* num indivíduo mamífero, proteger um indivíduo mamífero contra bactérias *Anaplasmataceae*, e tratar um indivíduo mamífero contra infecção por bactérias *Anaplasmataceae*. Tal prevenção, proteção ou tratamento podem incluir (sem limitação) a redução ou eliminação do risco de infecção por parte do organismo *Anaplasmataceae* patogénico, melhoramento ou alívio dos sintomas de uma infecção por tal organismo *Anaplasmataceae*, redução da carga bacteriana de *Anaplasmataceae*, diminuição da incidência ou duração das infeções por *Anaplasmataceae*, redução dos níveis de proteína em soro em fase aguda de bactérias *Anaplasmataceae*, redução das temperaturas retais, e/ou

aumento da ingestão de alimentos e/ou crescimento, por exemplo.

"Farmaceuticamente aceitável" conforme utilizado no presente documento refere-se a substâncias (por exemplo, adjuvantes, imunostimulantes, portadores, diluentes, agentes emulsificantes ou estabilizantes), que se encontram dentro do âmbito do bom julgamento médico, adequados para utilização em contacto com os tecidos dos indivíduos sem toxicidade indevida, irritação, resposta alérgica, e semelhantes, comensuráveis com uma razão de benefício para risco razoável, e eficazes para a utilização pretendida. As substâncias farmaceuticamente aceitáveis não interferem com a eficácia do agente terapêutico e não são tóxicas para o indivíduo ao qual são administradas.

"Indivíduo" ou "indivíduo mamífero" refere-se a qualquer animal tendo um sistema imune, que inclui mamíferos tais como seres humanos, gatos, gado, cavalos, suínos, e cães.

Pode também ser utilizado material cultivado de acordo com a presente invenção em aplicações diagnósticas para diagnosticar a presença de doenças ou afeções causadas por bactérias *Anaplasmataceae*. Exemplos não limitantes de tais aplicações diagnósticas incluem a utilização de frações, proteínas ou outras biomoléculas bacterianas em ensaios de ligação a anticorpos. As frações, proteínas ou outras biomoléculas bacterianas podem também ser utilizadas para gerar anticorpos policlonais ou monoclonais para tais ensaios.

Crescimento de Células Hospedeiras

São primeiro preparadas células hospedeiras para cultura de organismos bacterianos de acordo com a presente invenção anteriormente à infecção com o organismo bacteriano desejado. É semeada uma amostra de uma linha celular embrionária de felino em meio para crescimento ou suspenso ou por adesão. Conforme utilizado no presente documento,

condições de crescimento por adesão em que uma camada de células reveste superfícies contidas dentro da vesícula na qual as células são cultivadas. As superfícies podem incluir a superfície interior da vesícula em si, ou superfícies de vidro ou microesferas poliméricas contidas dentro da vesícula para aumentar a área de superfície. Podem também ser utilizados microportadores para aumentar a área de superfície e o crescimento das células hospedeiras. Em contraste com o crescimento por adesão, pode ser possível cultivar as células hospedeiras em suspensão, na qual as células hospedeiras não necessitam ser ligadas a superfícies dentro da vesícula de cultura.

O perito na especialidade está geralmente familiarizado com as variedades de meios de cultura que podem ser utilizados para cultivar as células hospedeiras. O meio de crescimento de células hospedeiras pode ser derivado a partir de animais. Alternativamente, o meio de crescimento de células hospedeiras pode ser à base de vegetais ou leveduras, e pode ser isento de proteínas animais. O meio de crescimento pode ser derivado a partir de extratos de soja ou a partir de outras plantas ricas em proteínas ou produtos alimentares vegetais ricos em proteínas incluindo, por exemplo, legumes. Exemplos não limitantes de meios específicos úteis para o crescimento de células hospedeiras incluem Meio Essencial Mínimo de Eagle (MEM), Meio Essencial Mínimo de Glasgow, RPMI1640, OptiMEM, AIM V.

O meio de crescimento pode conter ou ser suplementado com soro fetal bovino (FBS), solução de triptose, solução de hidrosolato de lactoalbumina, L-glutamina, bicarbonato de sódio; hidrolisado de lactalbumina, Polimixina B, piruvato de sódio, glucose, sulfato de magnésio.

Os meios de crescimento frescos podem ser realimentados ou reabastecidos às células hospedeiras antes ou após infecção ou exposição das células hospedeiras às

bactérias *Anaplasmataceae*.

As células podem ser cultivadas a 36-38 °C durante 2-9 dias a CO₂ a 5Í.

Infeção das Células Hospedeiras

As células hospedeiras podem ser expostas a ou infetadas com organismos bacterianos da família das Anaplasmatáceas ao colocar as células hospedeiras em contacto com outras células eucarióticas conhecidas como estando infetadas com os organismos bacterianos. O perito na especialidade está familiarizado com a determinação de se tais outras células eucarióticas a partir de um mamífero, por exemplo, estão infetadas com tais organismos bacterianos. As células de mamífero infetadas podem ser derivadas a partir de qualquer tecido, incluindo o baço, fígado, pâncreas, pulmões, coração ou outro tecido muscular, cérebro, vesícula biliar, sangue, rins, nódulos linfáticos ou estômago. As células de mamíferos infetadas podem ser preparadas a partir de um extrato de tecido através de homogeneização por misturador numa solução isotónica adequada. O homogenado pode então ser utilizado para inocular (isto é, infetar) uma cultura de células hospedeiras, aplicado como uma camada de células hospedeiras ou simplesmente colocado em contacto com as mesmas.

Alternativamente, as células hospedeiras podem ser expostas a ou infetadas com organismos bacterianos isolados da família das Anaplasmatáceas. O perito na especialidade está familiarizado com técnicas de isolamento de tais organismos bacterianos, ou pode obter soluções-mãe de organismos bacterianos isolados a partir de um depósito biológico.

O meio de crescimento utilizado para preparar células hospedeiras antes do contacto com bactérias *Anaplasmataceae* pode ser o mesmo que o meio utilizado para propagar as células hospedeiras após tal contacto. As células

hospedeiras expostas (ou infetadas) por bactérias *Anaplasmataceae* podem ser cultivadas durante até 95 dias, até 35 dias, ou durante até 5 a 10 dias, para alcançar um título de TCID₅₀ (Dose Infeciosa de Cultura de Tecido) >1x10⁴, e posteriormente a cultura pode ser colhida e processada.

Recolha

As células hospedeiras infetadas com bactérias *Anaplasmataceae* podem ser colhidas ao recolher os fluidos e/ou células da cultura de tecido celular. As células hospedeiras podem ser colhidas a partir do meio (e das vesículas de cultura) com as células bacterianas *Anaplasmataceae* contidas dentro das paredes das células hospedeiras. Alternativamente, durante a recolha a concentração das bactérias *Anaplasmataceae* pode ser enriquecida através de técnicas que melhoram a libertação das células bacterianas ineficazes a partir do substrato de crescimento, por exemplo sonicação, congelamento e descongelamento, aquecimento ou lise enzimática química ou seletiva das células hospedeiras eucarióticas. Uma colheita enriquecida de bactérias *Anaplasmataceae* pode incluir material que é isento de células hospedeiras ou material celular hospedeiro. Alternativamente, uma colheita enriquecida de bactérias *Anaplasmataceae* pode incluir material que contém células hospedeiras ou material celular hospedeiro.

Inativação

O perito na especialidade está geralmente familiarizado com as técnicas através das quais as células bacterianas ou hospedeiras podem ser mortas ou inativadas. Tais técnicas incluem, meios físicos, químicos e biológicos. Exemplos não limitantes de técnicas de inativação incluem sonicação, técnicas de congelamento e descongelamento, pressão, tratamento com calor, químicos ou enzimas. Exemplos não limitantes de agentes de inativação

química incluem tratamento com etilenoimina binária (BEI), formalina (solução de formaldeído), beta-propiolactona, mertiolato, glutaraldeído, dodecilssulfato de sódio, ou semelhantes, ou uma mistura dos mesmos. As células hospedeiras podem também ser inativadas através de calor ou psoraleno na presença de luz ultravioleta. Estes agentes de inativação química ou meios de inativação física podem também ser utilizados para inativar as células bacterianas de *Anaplasmataceae* após estas terem sido extraídas ou separadas a partir das células hospedeiras.

Formulação

As células hospedeiras inativadas, infetadas ou células bacterianas de *Anaplasmataceae* enriquecidas podem servir como o antigénio e podem ser formuladas como uma suspensão líquida ou podem ser liofilizadas para a sua utilização na preparação de uma vacina contra doenças causadas por organismos de *Anaplasmataceae*. O material cultivado de acordo com a presente invenção pode ser formulado com quaisquer adjuvantes, imunoestimulantes, portadores, diluentes, agentes emulsificantes ou estabilizantes farmacologicamente aceitáveis, exemplos não limitantes dos quais incluem são discutidos abaixo. O perito na especialidade, contudo, reconhecerá que podem ser utilizados outros adjuvantes, imunoestimulantes, portadores, diluentes, agentes emulsificantes ou estabilizantes na formulação de vacinas com base em material cultivado de acordo com a presente invenção.

Adjuvantes e Imunoestimulantes

Um adjuvante em geral é uma substância que potencia a resposta imune do alvo de forma não específica. São conhecidos vários adjuvantes diferentes na técnica. Exemplos não limitantes de adjuvantes que podem ser utilizados na formulação de uma vacina fabricada com material cultivado de acordo com a presente invenção incluem sais de alumínio (por exemplo, alúmen, hidróxido de

alumínio, fosfato de alumínio, óxido de alumínio), colesterol, adjuvantes de lípido A de monofosforilo, Amphigen, tocofenóis, lípido A de monofosfenilo, dipéptido de muramilo, emulsões de óleo, glucanos, carbómeros, copolímeros em bloco, adjuvante de lípido-amina Avridine enterotoxina termolábil a partir de *E. coli* (recombinante ou não), toxina da cólera, ou dipéptido de muramilo, Adjuvante Completo e Incompleto de Freund, vitamina E, polímeros e poliaminas em bloco não iônicos tais como dextransulfato, carbopol, pirano, saponinas e derivados de saponinas, copolímeros em bloco, e adjuvantes tais como os identificados nas Patentes U.S. N.ºs 4.578.269, 4.744.983, 5.254,339. Exemplos não limitantes de péptidos que podem servir como adjuvantes incluem péptidos de muramilo, dimetilglicina, ou tuftsina. Exemplos não limitantes de óleos que podem servir como adjuvantes incluem óleo mineral, óleos vegetais ou emulsões dos mesmos.

Podem ser formuladas vacinas fabricadas a partir de material cultivado de acordo com a presente invenção como emulsões de óleo-em-água ou como emulsões de água-em-óleo. Exemplos não limitantes de emulsões de óleo-em-água incluem emulsões de óleo-em-água de parafina, ou emulsões formadas por um ou mais de esqualeno, copolímeros em bloco de óxido de etileno e óxido de propileno, tensioativos de polissorbato, e/ou análogos de treonilo de dipéptido de muramilo.

Os óleos utilizados como adjuvantes podem ser metabolizáveis por parte do indivíduo recebendo a vacina tais como óleos vegetais ou animais. Tais óleos consistem tipicamente amplamente em misturas de triacilgliceróis, também conhecidos como triglicerídeos ou gorduras neutras. Estas substâncias apolares, insolúveis em água são triésteres de ácidos gordos de glicerol. Os triacilgliceróis diferem de acordo com a identidade e localização dos seus três resíduos de ácido gordo.

Os adjuvantes podem também ser não metabolizáveis consistindo em componentes que não podem ser metabolizados pelo corpo do indivíduo animal ao qual a emulsão é administrada. Óleos não metabolizáveis adequados para utilização nas emulsões da presente invenção incluem alcanos, alcenos, alcinos, e os seus correspondentes ácidos e álcoois, os éteres e ésteres dos mesmos, e misturas dos mesmos. Os compostos individuais do óleo podem ser compostos de hidrocarboneto leves, por exemplo, compostos tendo 6 a 30 átomos de carbono. O óleo pode ser preparado sinteticamente ou purificado a partir de produtos de petróleo. Exemplos não limitantes de óleos não metabolizáveis para utilização na preparação de vacinas à base de material cultivado de acordo com a presente invenção incluem óleo mineral, óleo de parafina, e cicloparafinas, por exemplo. O termo "óleo mineral" refere-se a um óleo adjuvante não metabolizável que é uma mistura de hidrocarbonetos líquidos obtida a partir de petrolato através de uma técnica de destilação. O termo é sinónimo de "parafina liquidificada", "petrolato líquido" e "óleo mineral branco". O termo também pretende incluir "óleo mineral leve", isto é, óleo que é obtido de forma semelhante através de destilação de petrolato, mas que tem uma gravidade específica ligeiramente menor do que o óleo mineral branco.

Outros compostos capazes de potenciar uma resposta de imunidade humoral que pode ser utilizada na formulação de vacinas à base de material cultivado de acordo com a presente invenção incluem, sem limitação, copolímero de anidrato maleico de etileno (EMA), emulsões de látex de um copolímero de estireno com uma mistura de ácido acrílico e ácido metacrílico.

Para além do adjuvante, uma vacina à base de material cultivado de acordo com a presente invenção pode incluir agentes imunomoduladores tais como, por exemplo,

interleucinas, interferões, ou outras citocinas (por exemplo, citocinas relacionadas com Th1, tais como interleucina-12 (IL-12), interleucina-18 (IL-18), ou interferão gama).

A quantidade de adjuvante ou imunoestimulante adicionado numa formulação de vacina à base de material cultivado de acordo com a presente invenção depende da natureza do adjuvante ou imunoestimulante em si. O perito na especialidade é capaz de selecionar uma quantidade que é suficiente para potenciar uma resposta imune ao agente de imunização bacteriano de *Anaplasmataceae*.

Portadores

Portadores farmacêuticamente aceitáveis adequados para utilização em vacinas formuladas à base de material cultivado de acordo com a presente invenção podem ser qualquer portador líquido convencional adequado para composições farmacêuticas veterinárias, incluindo soluções de sal equilibradas tais como são adequadas para utilização em meios de cultura de tecido. Os portadores farmacêuticamente aceitáveis são entendidos como sendo compostos que não afetam de forma adversa a saúde do animal a ser vacinado, pelo menos não até ao ponto em que o efeito adverso é pior do que os efeitos vistos quando o animal não é vacinado. Portadores adequados também incluem água estéril, solução salina, tampões aquosos tais como PBS, solventes, diluentes, agentes isotónicos, agentes de tamponamento, dextrose, etanol, manitol, sorbitol, lactose e glicerol, e semelhantes.

Veículo

Vacinas formuladas a partir de material cultivado de acordo com a presente invenção podem também compreender um veículo. Um veículo é um composto ao qual as células hospedeiras, células bacterianas *Anaplasmataceae*, ou proteínas, fragmentos proteicos, ácidos nucleicos ou partes dos mesmos, aderem, sem estar covalentemente aderidos ao

mesmo. Exemplos não limitantes de tais veículos incluem bio-microcápsulas, micro-alginatos, lipossomas e macrossóis. Alguns materiais que servem como adjuvantes podem também servir como veículos tais como hidróxido de alumínio, fosfato de alumínio, sulfato de alumínio ou óxido de alumínio, sílica, caulino, e bentonita, todos conhecidos na técnica.

Estabilizantes

Frequentemente, uma vacina é misturada com estabilizantes, por exemplo para proteger os componentes propensos a degradação de serem degradados, para potenciar a vida útil da vacina, ou para melhorar a eficácia do congelamento e descongelamento. Exemplos não limitantes de estabilizantes que podem ser adicionados a formulações de vacinas à base de material cultivado de acordo com a presente invenção incluem SPGA (Bovarnik et al., 1950, J. Bacteriology, vol. 59, p. 509), leite desnatado, gelatinas, albumina sérica bovina, hidratos de carbono (por exemplo sorbitol, manitol, trealose amido, sacarose, dextrano ou glucose), proteínas (por exemplo, albumina, caseína ou produtos de degradação da mesma), estabilizantes de origem não animal, e tampões (por exemplo fosfatos de metal alcalino). Em composições de vacinas liofilizadas, podem ser adicionados um ou mais estabilizantes.

Vacinas Multivalentes

O agente imunogénico colhido a partir do material cultivado de acordo com a presente invenção pode ser formulado numa vacina compreendendo um ou mais agentes imunogénicos adicionais. O(s) componente(s) imunoativo(s) adicional(ais) pode(m) ser parasitas, bactérias ou vírus inteiros (inativados ou modificados vivos), ou uma porção fracionada ou extrato dos mesmos (por exemplo, proteínas lípidos, lipopolissacarídeos, hidratos de carbono ou ácidos nucleicos).

Onde o agente imunogénico colhido a partir do

material cultivado de acordo com a presente invenção é utilizado numa vacina canina, podem ser adicionados antigénios para outros agentes patogénicos caninos na formulação. Exemplos não limitantes de outros agentes patogénicos para os quais podem ser adicionados antigénios adicionais incluem *Bordetella bronchiseptica*, vírus da cinomose canina (CDV), adenovírus canino de tipos 1 e 2 (CAV-1, CAV-2), vírus de parainfluenza canina (CPI), coronavírus canino (CCV), parvovírus canino (CPV), *Leptospira interrogans* serovar *canicola*, *Leptospira interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae*, *Leptospira interrogans* serovar *bratislava*, *Leptospira interrogans* serovar *pomona*; *Leptospira kirschneri* serovar *grippotyphosa*, vírus da raiva, *Borrelia burgdorferi*, rotavírus canino (CRV), herpesvírus canino (CHV), e Vírus Minuto de Caninos (MCV), *Babesia canis*, *Giardia* e *Leishmania*.

Alternativamente, pode ser administrada uma vacina à base de material cultivado de acordo com a presente invenção simultaneamente ou concomitantemente com outras vacinas vivas ou inativadas.

Congelamento e Descongelamento / Reconstituição

Por razões de estabilidade ou economia, as vacinas à base de material cultivado de acordo com a presente invenção podem ser secas por congelamento. Em geral isto permitirá o armazenamento prolongado a temperaturas superiores a 0 °C, por exemplo a 4 °C. São conhecidos procedimentos para secagem por congelamento para os peritos na especialidade; encontra-se disponível comercialmente equipamento para secagem por congelamento a diferentes escalas. Para reconstituir a vacina seca por congelamento, pode ser suspensa num diluente fisiologicamente aceitável. Tais portadores podem ser tão simples como água estéril, ou uma solução de sal fisiológica ou outro portador conforme discutido acima.

Dosagens

As vacinas à base de material cultivado de acordo com a presente invenção podem ser formuladas numa forma farmacêutica unitária para facilitar a administração e garantir a uniformidade da dosagem. No presente documento, uma unidade de dosagem no que se refere à composição da vacina refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para animais, cada unidade contendo uma quantidade predeterminada de agente imunogénico bacteriano de *Anaplasmataceae* calculada para produzir o efeito imunogénico desejado em associação com o sistema de adjuvante e portador ou veículo requeridos.

A quantidade de imunização eficaz de agente imunogénico bacteriano de *Anaplasmataceae* pode variar dependendo da estirpe ou estirpes eleitas e pode ser qualquer quantidade suficiente para evocar uma resposta imune protetora. Por exemplo, são adequadas quantidades em que a unidade de dosagem compreende bacterina inativada de *Anaplasmataceae* a TCID₅₀ de pelo menos cerca de 1×10^4 .

Administração

A administração da vacina a um indivíduo resulta na estimulação de uma resposta imune no indivíduo mamífero. A via de administração para vacinas à base de material cultivado de acordo com a presente invenção pode ser administrada ao alvo mamífero de acordo com métodos conhecidos na técnica. Tais métodos incluem, mas não estão limitados a, intradérmicos, intramusculares, intraoculares, intraperitoneais, intravenosos, orais, oronasais, e subcutâneos, bem como através de inalação, supositórios, ou transdérmicos. Vias de administração incluem intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, oronasal, e injeção subcutânea. A vacina pode ser administrada através de quaisquer meios que incluem, mas não estão limitados a, seringas, nebulizadores, atomizadores, dispositivos de injeção sem seringa, ou pistolas de genes de bombardeamento

de microprojéteis (Bombardeamento biobalístico).

Vias de aplicação alternativas que são factíveis são através de aplicação tópica como gotas, *spray*, gel ou pomada no epitélio mucoso do olho, nariz, boca, ano, ou vagina, ou na epiderme da pele exterior em qualquer parte do corpo; através de pulverização como aerossol, ou pó. Alternativamente, a aplicação pode ser através da via alimentar, através de combinação com a comida, água para alimento ou bebida por exemplo como um pó, um líquido, ou comprimido, ou através de administração directa na boca como um líquido, um gel, um comprimido, ou uma cápsula, ou no ânus como um supositório. A via de aplicação preferida é através de injeção intramuscular ou subcutânea.

A vacina de acordo com a invenção pode estar em várias formas, por exemplo: um líquido, um gel, uma pomada, um pó, um comprimido, ou uma cápsula, dependendo do método desejado de aplicação ao alvo.

O esquema da aplicação da vacina de acordo com a invenção ao alvo mamífero pode ser em doses únicas ou múltiplas, que podem ser administradas ao mesmo tempo ou sequencialmente, de uma forma compatível com a dosagem e formulação, e numa tal quantidade conforme seja imunologicamente eficaz.

Modelo de Desafio

De modo a estudar e avaliar eficazmente os mecanismos patogénicos das bactérias *Anaplasmataceae* e os mecanismos de defesa dos hospedeiros mamíferos e desta forma avançar na técnica das vacinas e melhorar os produtos de vacinas, deve ser empregue um modelo de desafio eficaz.

Um modelo de desafio para a erliquiose canina, por exemplo, pode ser baseado na percentagem de animais de teste demonstrando sintomas clínicos persistentes e graves que são comumente associados com a erliquiose canina, tais como febre, trombocitopenia, secreção ocular mucopurulenta, desidratação, ou semelhantes. Alternativamente, pode ser

empregue o modelo de desafio descrito pelo Pedido U.S. N.º 2006/0188524 publicado. Este desafio de *E. canis* pode ser obtido num animal de teste ao administrar ao dito animal de teste uma solução-mãe de desafio de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) contendo uma cultura virulenta de bactérias *E. canis* vivas. A cultura virulenta de *E. canis* é preparada passando repetidamente o microrganismo de *E. canis* tal como *E. canis* Ebony, *E. canis* Broadfoot ou semelhante, num hospedeiro; separando as PBMC a partir da amostra de sangue do hospedeiro; e misturando as PBMC separadas com soro fetal bovino a 20Í e sulfóxido de dimetilo a 10Í.

Um método para a indução de erliquiose canina clínica num animal de teste inclui administrar ao dito animal uma quantidade eficaz de uma solução-mãe de desafio de *E. canis*, consistindo essencialmente num microrganismo de *E. canis* virulento em células mononucleares de sangue periférico. Foram depositadas culturas viáveis de *E. canis* Broadfoot (algumas vezes referido como *E. canis* BF, ou Broadfoot), e *E. canis* Ebony (algumas vezes referido como Ebony) (11 feb. 2004) com o ATCC, 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209 E.U.A., e foram-lhes respetivamente atribuídos os números de acesso ATCC PTA-5811 para a estirpe Broadfoot, e PTA-5812 para a estirpe Ebony.

Existem vários outros métodos de diagnóstico celular para determinar a presença de infeção. Por exemplo, a presença de infeção pode ser determinada através de imunofluorescência direta. Outros métodos de deteção de infeção incluem coloração, por exemplo, Giemsa, Wright/Giemsa. Pode também ser utilizado Laranja de Acridina para corar os organismos.

A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos utilizados no presente documento possuem o mesmo significado como habitualmente entendido

por um perito na especialidade ao qual esta invenção pertence.

Para um entendimento mais claro da invenção, são estabelecidos os seguintes exemplos abaixo. Estes exemplos são meramente ilustrativos e não são entendidos como limitando o âmbito ou subjazendo princípios da invenção de qualquer forma. Com efeito, várias modificações da invenção, para além daquelas mostradas e descritas no presente documento, tornar-se-ão aparentes para os peritos na especialidade a partir dos exemplos estabelecidos abaixo no presente documento e da anterior descrição. Tais modificações destinam-se também a entrar no âmbito das reivindicações anexas.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Crescimento de *E. canis* em Células FEF na presença de Células DH82

1.1 Propagação de Células DH82 Não Infetadas

Um frasco congelado de células DH82 não congeladas (American Type Culture Collection (ATCC) n.º de acesso CRL-10389, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108) foi descongelado, clarificado, e utilizado para inocular um balão de cultura celular de 75 cm² contendo Meio de Cultura DH82, e incubado a 37 °C com CO₂ a 5Í. O Meio de Cultura DH82 consiste em base MEM de Dulbecco suplementada com soro bovino fetal (FBS) a 10Í e HEPES a 1Í. Após formação de uma monocamada, as células foram raspadas no meio de cultura, colhidas, e centrifugadas a 1.500 rpm durante 10 min. O sedimento celular foi ressuspenso em 5 ml de Meio de Cultura DH82 fresco e separado a uma razão variando desde 1:3 até 1:5.

1.2 Infeção de Células DH82 Não Infetadas com Células DH82 Infetadas por *E. canis*

Um frasco congelado de células DH82 infetadas com *E. canis* (N.º de acesso ATCC CRL - 10390) foi descongelado, clarificado, e utilizado para inocular um balão de cultura celular de 175 cm² contendo uma monocamada (confluência 80-

90Í) com aproximadamente 10^7 células DH82 não infetadas em Meio de Cultura DH82. As culturas de DH82 infetadas com *E. canis* foram mantidas através de realimentação, isto é, substituição de 50Í do meio de cultura gasto com Meio de Cultura DH82 fresco conforme descrito acima. As culturas infetadas com *E. canis* foram monitorizadas utilizando o método de coloração Diff-Quick em lâminas contendo células fixas com acetona de acordo com as instruções do fabricante (VWR, West Chester, PA n.º 47733-150) ou uma técnica de anticorpos imunofluorescentes (IFA) padrão. Brevemente, foram incubadas placas contendo células fixas com acetona a partir de culturas DH82 infetadas com *E. canis* ou não infetadas com um soro de cão de *E. canis* policlonal, lavadas com PBS, incubadas com IgG gama de cabra anti cão etiquetada com fluoresceína (Kirkegaard e Perry n.º 02-19-02), lavadas com PBS, e examinadas com um microscópio de fluorescência.

1.3 Propagação de Células FEF Não Infetadas

Um frasco de células fibroblásticas embrionárias de felino (FEF) congeladas foi descongelado, clarificado, e utilizado para inocular um balão de cultura celular de 175 cm² contendo Meio de Cultura FEF, e incubado a 37 °C com CO₂ a 5Í. O Meio de Cultura FEF consiste em meio M6B8 (base MEM, base Glasgow-MEM, triptose fosfato, triptose, hidrosolato de lactoalbumina, L-glutamina, e bicarbonato de sódio) e FBS a 5Í. Após incubação durante 4-5 dias, as culturas estiveram prontas para passagem quando a monocamada teve uma confluência de 90-95Í. Após tratamento com tripsina a 0,25Í, as células foram separadas a uma razão de :5 a 1:10.

1.4 Infecção de Células FEF Não Infetadas com Células DH82 Infetadas por *E. canis*

Foram colhidas células DH82 infetadas por *E. canis* através de raspagem no meio de cultura, centrifugadas a 1.500 rpm durante 10 min, e ressuspensas a 1×10^6 células/ml

em Meio de Cultura DH82 fresco. Foram suspensas culturas de FEF não infetadas que foram semeadas a 6×10^6 células por balão de cultura celular de 175 cm^2 em Meio de Cultura FEF e incubadas durante 18-24 h a 37°C com CO_2 a 5Í em meio de cultura e colocadas em balões de cultura celular de 75 cm^2 a uma razão de separação de 1:3. Foram então utilizados seis ml de células DH82 infetadas com *E. canis* ressuspensas para infetar cada balão de cultura celular de 75 cm^2 contendo células FEF não infetadas em suspensão, e incubados a 37°C com CO_2 a 5Í. As culturas mistas de DH82/FEF infetadas com DH82 foram alimentadas cada três dias substituindo o meio de cultura fresco com Meio de Cultura FEF fresco. 14 dias após a infeção, as culturas mistas foram separadas 1: 2 e as suspensões celulares foram transferidas para os poços de placas de cultura de 24 poços a 1 ml por poço. Após incubação durante 16 h a 37°C com CO_2 a 5Í, os sobrenadantes das culturas a partir dos poços foram transferidos para lâminas, fixos com acetona, e avaliados para a presença de infeção por *E. canis* utilizando IFA conforme descrito acima.

Exemplo 2: Crescimento de *E. canis* numa População Homogénea de Células FEF

Foram infetados cães por via intravenosa com 0,5 - 2 ml de células DH82 infetadas com *E. canis* expandidas a partir de células obtidas a partir da ATCC conforme descrito acima. Tais células infetadas com *E. canis* são descritas na Patente U.S. N.º 5.192.679. Os cães foram identificados positivamente como estando infetados com *E. canis* através de PCR de ADN do baço e do sangue. O ADN foi purificado a partir de amostras de sangue e tecido utilizando um QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) de acordo com as instruções do fabricante. A PCR foi realizada num termociclador robótico RoboCycler® (Stratagene, Cedar Creek, TX) utilizando reações de 25 µl consistindo em 2,5 µl de tampão de reação 10X (Genscript Corporation,

Piscataway, NJ), 0,2 µl de dNTPs a 100 mM (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA), 1 µl de iniciador oligonucleotídico 1 (5'-AGA ACG AAC GCT GGC AAG C-3") e iniciador oligonucleotídico 2 (5'-CGT ATT ACC GCG GCT GGC A-3') a 10 µM, e 0,2 µl de *Taq* polimerase a 5U/µl (Genscript Corp.) num protocolo de termociclagem consistindo numa etapa de desnaturação preliminar de 94 °C durante 5 min, seguida por 35 ciclos de 94 °C durante 1 min., 60 °C durante 1 min, e 72 °C durante 1 min, seguido por uma etapa de alongamento final de 72 °C durante 10 minutos. Foram preparados homogenados em meio de cultura fresco a partir de amostras de baços, nódulos linfáticos, ou células mononucleares de nódulos linfáticos (PBMCs) obtidos a partir de cães infetados com *E. canis* e utilizados como um revestimento para infetar células FEF.

O homogenado de baço infetado com *E. canis* foi inoculado em células FEF não infetadas em dois balões de cultura de 75 cm² contendo 30 ml de suspensão de células FEF semeadas a 2 x 10⁵ células /ml por frasco levando o homogenado a uma diluição final de 1:10 até 1:100. Após 18-24 horas de incubação a 37 °C com CO₂ a 5%, o meio de cultura foi substituído com 30 ml de Meio de Cultura FEF fresco. Após 5-7 dias de incubação, a monocamada de células foi tripsinizada e ressuspensa em 5-10 ml de Medio de Cultura FEF fresco. Cinco ml desta suspensão foram então inoculados em cada um de dois balões de cultura de 175 cm² contendo 50 ml de Meio de Cultura FEF. As células foram então incubadas durante 7-10 dias a 37 °C com CO₂ a 5%. Para manter a viabilidade, as culturas requereram "alimentação", que foi alcançada substituindo 50% de meio de cultura gasto com Meio de Cultura FEF fresco. Após 10-14 dias adicionais de incubação a 37 °C com CO₂ a 5%, as células foram tripsinizadas e ressuspensas conforme descrito acima. Para manter propagação contínua, foram passados 1 a 2 ml de suspensão de células FEF para células

FEF não infetadas e incubados a 37 °C com CO₂ a 5Í. As culturas infetadas foram passadas 7 a 13 vezes utilizando tempos de incubação variando desde 4 até 14 dias. A presença de *E. canis* nas células FEF cultivadas foi confirmada através da utilização de IFA e PCR conforme descrito acima.

Exemplo 3: Crescimento de *E. canis* numa População Homogénea de Células FCWF-4

3.1 Propagação de Células FCWF-4 Não Infetadas (N.º ATCC CRL-2787)

Um frasco congelado de células fetais inteiras de *Felis catus* 4 (FCWF-4) não infetadas (N.º de acesso ATCC CRL-2787) clarificado, e utilizado para inocular um balão de cultura celular de 75 cm² contendo Meio de Cultura FCWF, e incubado a 37 °C com CO₂ a 5Í. O Meio de Cultura FCWF consiste em E-MEM (Meio Essencial Mínimo de Eagle com solução de sal equilibrada de Earle e L-glutamina a 2 mM), piruvato de sódio a 1,0 mM, aminoácidos não essenciais a 0,1 mM, bicarbonato de sódio a 1,5 g/litro, e FBS a 10Í. Após 4-5 dias de incubação, a monocamada de confluência de 90-95Í foi tratada com tripsina a 0,25Í e separada a uma razão de 1:4 a 1:6.

3.2 Preparação de População Homogénea de Células FCWF-4 Infetadas com *E. canis*

Anteriormente à infeção com *E. canis*, foram semeadas células FCWF-4 não infetadas num balão de 175 cm² a 6x10⁶ células por balão e incubadas durante 18-24 h. Foi utilizado homogenado infetado com *E. canis* para infetar células FCWF-4 conforme descrito para células FEF exceto que foi utilizado o Meio de Cultura FCWF em lugar do Meio de Cultura FEF. A presença de *E. canis* nas células FCWF-4 cultivadas foi confirmada através da utilização de IFA e PCR conforme descrito acima.

Exemplo 4: Crescimento de *E. muris* numa População Homogénea de Células FEA

4.1 Propagação de Células Embrionárias de Felino FEA

Um frasco de células embrionárias de felino FEA congeladas foi descongelado, clarificado e utilizado para inocular um balão de 75 cm² contendo Meio de Cultura FEA, e incubado a 37 °C com CO₂ a 5Í. O Meio de Cultura FEA consiste em MEM de Dulbecco, L-glutamina a 2 mM, piruvato de sódio a 1,0 mM e FBS a 10Í. Após 7 dias de incubação, a monocamada confluenta foi tratada com tripsina a 0,25Í e passada a uma razão de separação de 1:2.

4.2 Preparação de População Homogênea de Células Embrionárias de Felino FEA Infetadas com *E. muris*

Foram propagadas células DH82 não infetadas conforme descrito acima, e infetadas com *E. muris* utilizando células DH82 infetadas com *E. muris* (N.º de acesso ATCC R- 1411 - estirpe Asuke). O protocolo para a preparação de materiais e infecção seguiu essencialmente o protocolo conforme descrito acima para as células DH82 infetadas com *E. canis*, exceto que as células DH82 infetadas com *E. muris* foram substituídas por células DH82 infetadas por *E. canis*. Foram infetados ratinhos por via intraperitoneal com 0,5 ml de células DH82 infetadas com *E. muris*.

Os ratinhos foram identificados positivamente como estando infetados com *E. muris* através de PCR de ADN do baço e do sangue. Foi purificado ADN a partir de amostras de sangue e tecido utilizando um QIAamp DNA Mini Kit da Qiagen de acordo com as instruções do fabricante. Foi realizada PCR num termociclador robótico RoboCycler® (Stratagene) utilizando reações de 25 µl consistindo em 2,5 µl de tampão de reação 10x (Genscript), 0,2 ml de dNTPs a 100 mM (Invitrogen), 1 µl de iniciador oligonucleotídico 1 (5'-AGA ACG AAC GCT GGC GGC AAG C-3") e iniciador oligonucleotídico 2 (5'-CGT ATT ACC GCG GCT GCT GGC A-3') a 10µM, e 0,2 µl de *Taq* polimerase a 5U/µl (Genscript Corp.) num protocolo de termociclagem consistindo numa etapa de desnaturação preliminar de 94 °C durante 5 min, seguida por

35 ciclos de 94 °C durante 1 min., 60 °C durante 1 min, e 72 °C durante 1 min, seguido por uma etapa de alongamento final de 72 °C durante 10 minutos.

Foram preparados homogenados em meio de cultura fresco a partir de amostras de baço obtidas a partir de ratinhos infetados com *E. muris* e utilizados em células embrionárias de felino FEA. Um ml do homogenado de baço de ratinho infetado com *E. muris* foi inoculado em células embrionárias de felino FEA não infetadas num balão de cultura celular de 25 cm² contendo uma monocamada de células embrionárias de felino FEA com 24 horas (a confluência de ~80Í) e 8 ml de meio de cultura FEA a uma diluição final de homogenado de 1:9. Após 5-24 horas de incubação a 37 °C com CO₂ a 5Í, o meio de cultura foi substituído com 38 ml de Meio de Cultura FEA fresco. Após 5-7 dias de incubação, a monocamada de células foi tripsinizada e ressuspensa em 2 ml de Meio de Cultura FEA fresco. Um ml desta suspensão de células infetadas com *E. muris* foi inoculado num balão de cultura celular de 75 cm² contendo uma monocamada de células embrionárias de felino FEA com 24 horas e 30 ml de meio de cultura FEA. As células foram incubadas durante 4-7 dias a 37 °C com CO₂ a 5Í. As culturas infetadas foram passadas 5 vezes utilizando tempos de incubação variando desde 4-9 dias a 37 °C com CO₂ a 5Í. Para passagem adicional, 1 a 2 ml de células infetadas que foram tripsinizadas e ressuspensas em 4 a 8 ml de meio de cultura foram utilizados para infetar células embrionárias de felino FEA não infetadas adicionais. As células infetadas foram inoculadas em balões contendo monocapa de células embrionárias de felino FEA com 24 horas, incubadas durante 5-48 horas a 37 °C com CO₂ a 5Í, realimentadas com meio de cultura fresco, e adicionalmente incubadas durante 4-9 dias a 37 °C com CO₂ a 5Í. A presença de *E. muris* nas culturas de células embrionárias felinas FEA foi confirmada através da utilização de IFA e PCR, conforme descrito

acima.

Exemplo 5: Crescimento de *E. muris* numa População Homogênea de Células FEF

Foram preparados homogenados em meio de cultura a partir de amostras de tecido obtidas a partir de ratinhos infetados com *E. muris* conforme descrito acima e foram utilizados para infetar células FEF, cultivadas conforme descrito acima. Cada linha celular não infetada foi inoculada com 0,5 ml de homogenado de baço infetado com *E. muris* por balão de cultura celular de 25 cm² que continha uma monocamada com 24 horas e 8 ml de meio de cultura. Esta é uma diluição final de homogenado de 1:17. Após 24 horas de incubação a 37 °C com CO₂ a 5Í, o meio de cultura foi substituído com 8 ml de meio de cultura fresco adequado. Após 7 dias de incubação, a monocamada celular foi tripsinizada e o conteúdo de células infetadas total do balão de 25 cm² foi inoculado num balão de 75 cm² contendo 30 ml de meio fresco (esta é uma separação de 1:3,75). As culturas infetadas foram passadas 2 vezes utilizando tempos de incubação variando desde 7-8 dias a 37 °C com CO₂ a 5Í. A presença de *E. muris* nas culturas de células foi confirmada através da utilização de IFA e PCR, conforme descrito acima.

Exemplo 6: Crescimento de *E. muris* numa População Homogênea de Células FCWF-4

Foram preparados homogenados em meio de cultura a partir de amostras de tecido obtidas a partir de ratinhos infetados com *E. muris* conforme descrito acima e foram utilizados para infetar células FCWF-4, cultivadas conforme descrito acima. Cada linha celular não infetada foi inoculada com 0,5 ml de homogenado de baço infetado com *E. muris* por balão de cultura celular de 25 cm² que continha uma monocamada com 24 horas e 8 ml de meio de cultura. Esta é uma diluição final de homogenado de 1: 17. Após 24 horas de incubação a 37 °C com CO₂ a 5Í, o meio de cultura foi

substituído com 8 ml de meio de cultura fresco adequado. Após 7 dias de incubação, a monocamada celular foi tripsinizada e o conteúdo de células infetadas total do balão de 25 cm² foi inoculado num balão de 75 cm² contendo 30 ml de meio fresco (esta é uma separação de 1:3,75). As culturas infetadas foram passadas 2 vezes utilizando tempos de incubação variando desde 7-8 dias a 37 °C com CO₂ a 5Í. A presença de *E. muris* nas culturas de células foi confirmada através da utilização de IFA e PCR, conforme descrito acima.

Exemplo 7: Infeção de células FEF com células P388D1 infetadas com *N. risticii*

Podem ser preparados materiais para infetar células FEF com *N. risticii* a partir de células P388D1 infetadas com *N. risticii* conforme descrito acima, ou conforme previamente descrito em Vemulapalli, R. et al., J. Clin. Micro. 33(11): 2987-2993 (1995), ou conforme previamente descrito na Patente US N° 4.759.927.

Foram adicionadas células P388D1 (N.º de acesso ATCC CCI-46) infetadas com a estirpe 90-12 de *N. risticii* a uma multiplicidade de infeção (MOI) de 0,0006 to 0,0028 em garrafas cilíndricas de 850 cm² contendo monocamadas de células FEF com 3-4 dias. Anteriormente à infeção, o meio de cultura gasto nas garrafas cilíndricas foi substituído com 300 ml do meio de cultura utilizado para a infeção. Após inoculação à MOI especificada, as garrafas cilíndricas foram incubadas a 37 °C sem CO₂. O meio de cultura testado incluiu mas não esteve limitado a D-MEM, MEM Earles, e M6B8; foi utilizado FBS a 0 a 5Í. As culturas infetadas foram colhidas quando o efeito citopático (CPE) alcançou 75Í a 85Í, o que variou entre 8-16 dias dependendo da MOI utilizada. O CPE observado incluiu inchaço, arredondamento, e destacamento de células infetadas. As culturas foram colhidas golpeando os lados das garrafas cilíndricas para libertar as células no meio de cultura. A presença de

infecção foi confirmada utilizando um protocolo IFA padrão em células que foram fixas com acetona 70011> e metanol a 30Í em placas de 96 poços com um anticorpo monoclonal de *N. risticii* e IgG de cabra anti ratinho etiquetada com fluoresceína (Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX).

Exemplo 8: Infecção de Células MA-104 com *E. muris*

8.1. Propagação de Células MA-104 Não Infetadas

Um frasco de células MA-104 (células epiteliais de rim de embrião de macaco) congeladas, n.º de acesso ATCC CRL-2378.1) foi descongelado, clarificado, e utilizado para inocular um balão de cultura celular de 75 cm² contendo Meio de Cultura MA-104, e incubados a 37°C com CO₂ a 5Í. O Meio de Cultura MA-104 consiste em Meio Essencial Mínimo de Eagle com BSS de Earles e L-glutamina a 2 mM (EMEM) que é suplementado com piruvato de sódio a 1,0 mM, aminoácidos não essenciais a 0,1 mM, bicarbonato de sódio a 1,5 g/l, L-glutamina adicional a 1Í e FBS a 10Í. Após incubação durante 5-7 dias, as culturas estiveram prontas para passagem quando a monocamada teve uma confluência de 90-95Í. Após tratamento com tripsina a 0,25Í, as células foram passadas a uma razão de separação de 1:5 a 1:10.

8,2. Preparação de População Homogénea de Células MA 104 Infetadas com *E. muris*

Foram preparados homogenados a partir de amostras de baço obtidas a partir de ratinhos infetados com *E. muris* e utilizados para infetar células MA-104. Foi utilizado homogenado de baço de ratinho infetado com *E. muris* para revestir células MA-104 em balões de cultura celular de 25 cm². Foram inoculadas monocamadas de MA-104 com 24 horas a confluência «85Í com uma diluição de 1: 91 de homogenado de baço (0,1 ml de homogenado de baço em 9 ml de meio de balão com 24h de existência).

O Meio de Cultura MA-104 consiste em Meio Essencial Mínimo de Eagle com BSS de Earles e L-glutamina a 2 mM (EMEM) que é suplementado com piruvato de sódio a 1,0 mM,

aminoácidos essenciais a 0,1 mM, bicarbonato de sódio a 1,5 g/l, L-glutamina adicional a 1Í e FBS a 10Í. Após 5 dias de incubação a 37 °C com CO₂ a 5Í, as células foram tratadas com tripsina e todas as células foram ressuspensas em 30 ml de Meio de Cultura MA-104 fresco; estes 30 ml foram então dispensados num balão de cultura celular de 75 cm². Após 8 dias de incubação a 37 °C com CO₂ a 5Í, estas células foram tratadas com tripsina e todas as células foram ressuspensas em 50 ml de Meio de Cultura MA-104 fresco; estes 50 ml foram então dispensados num balão de cultura celular de 175 cm². Para passagem adicional, 3 ml de células infetadas que foram tripsinizadas e ressuspensas em 9-10 ml de meio de cultura foram inoculados em 50 ml de meio de cultura fresco em balões de cultura celular de 175 cm². Foram adicionadas células MA-105 não infetadas durante a passagem quando o efeito citopático nas células infetadas aparentou ser avançado, as células infetadas eram escassas, ou as células infetadas pareceram fracas. O intervalo de incubação para as células infetadas foi de 5-8 dias a 37 °C com CO₂ a 5Í. A presença de *E. muris* nas células MA-104 cultivadas foi confirmada através da utilização de IFA.

DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

Documentos de patente referidos na descrição

- US 6284238 B [0004]
- US 20060188524 A [0006] [0076]
- US 5192679 A [0009] [0085]
- US 20050202046 A [0009]
- US 5401656 A [0009]
- US 5869335 A [0009]
- US 5989848 A [0009]
- US 3616202 A [0009]
- US 20060057699 A [0009]
- US 20030003508 A [0009]
- US 5955359 A [0009]
- US 5976860 A [0009]
- US 5877159 A [0009]
- US 4578269 A [0055]
- US 4744983 A [0055]
- US 5254339 A [0055]
- US 4759927 A [0095]

Documentos de não patente citados na descrição

- Palmer in *Veterinary Protozoan and Hemoparasite Vaccines*. CRC Press Inc, 1989 [0003]
- RIKIHISA, Y. *Clinical Microbiology Reviews*, 1991, vol. 4, 286 [0006]
- MAEDA, K. et al. *N. Eng. J. Med.*, 1987, vol. 316, 853 [0006]
- DAWSON, J. E. et al. *J. Clin. Microbiol.*, 1991, vol. 29,

2741 [0006]

- Compendium of Veterinary Products. North American Compendiums, Ltd, 2001 [0008]
- **SUNITA MAHAN.** Immunisation of German shepherd dogs against canine ehrlichiosis using inactivated Ehrlichia canis organisms. *thesis*, May 1997 [0010]
- **JARRET, O. et al.** *J. gen. Virol.*, 1973, vol. 20, 169-175 [0024]
- **BOVARNIK et al.** *J. Bacteriology*, 1950, vol. 59, 509 [0064]
- **VEMULAPALLI, R. et al.** *J. Clin. Micro.*, 1995, vol. 33 (11), 2987-2993 [0095]

REIVINDICAÇÕES

1. Um método para a cultura contínua de *Ehrlichia canis* compreendendo:

- i) obter *Ehrlichia canis*;
- ii) obter células fibroblásticas embrionárias de felino;
- iii) infetar as células fibroblásticas embrionárias de felino com a dita *Ehrlichia canis*; e
- iv) cultivar continuamente as ditas células fibroblásticas embrionárias de felino em meio de cultura de células embrionárias de felino sob condições que conduzam à propagação das células fibroblásticas embrionárias de felino, desta forma cultivando continuamente a *Ehrlichia canis*.

2. Um método para a cultura contínua de *Ehrlichia canis* compreendendo:

- i) infetar um cão com *Ehrlichia canis*;
- ii) obter tecido infetado a partir do cão infetado;
- iii) obter células fibroblásticas embrionárias de felino;
- iv) colocar em contacto as células fibroblásticas embrionárias de felino com o tecido infetado; e
- v) cultivar continuamente as ditas células fibroblásticas embrionárias de felino em meio de cultura de células embrionárias de felino sob condições que conduzam à propagação das células fibroblásticas embrionárias de felino, desta forma cultivando continuamente a *Ehrlichia canis*.

3. O método de acordo com a reivindicação 2, em que o tecido infetado a partir do cão infetado é um homogenado de baço.

4. Uma composição compreendendo uma célula fibroblástica embrionária de felino infetada com *Ehrlichia canis*.